

Aus dem Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes und
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/ Saar

**Sicherheit und Effektivität der Dreifach-Thrombozytapherese als
Routineverfahren**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011**

vorgelegt von: Michael Stetzenbach

geb. am: 05.02.1986 in Kaiserslautern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 2 -
Abbildungsverzeichnis	- 4 -
Tabellenverzeichnis	- 5 -
Abkürzungsverzeichnis	- 7 -
1. Zusammenfassung	- 11 -
2. Einleitung	- 15 -
2.1 Geschichte und Entwicklung der Transfusionsmedizin	- 15 -
2.2 Thrombozyten: Aufbau, Funktion und Thrombopoese	- 18 -
2.3 Thrombozytenkonzentrate	- 21 -
2.3.1 Herstellung	- 21 -
2.3.2 Lagerung und Haltbarkeit	- 24 -
2.3.3 Qualitätskontrolle	- 25 -
2.4 Präparative Thrombozytapherese	- 26 -
2.4.1 Prinzip der Thrombozytapherese	- 26 -
2.4.2 Überblick über den Zellseparator Trima Accel (CaridianBCT)	- 27 -
2.5 Thrombozytentransfusionen	- 31 -
2.5.1 Indikationen	- 31 -
2.5.2 Wirksamkeitskriterien und Refraktärzustand	- 31 -
2.5.3 Nebenwirkungen	- 33 -
2.6 Zielsetzung der Arbeit	- 34 -
3. Material und Methodik	- 35 -
3.1 Studiendesign und Spenderauswahl	- 35 -
3.2 Durchführung der Thrombozytenspende	- 36 -
3.3 Thrombozytaphereseprotokoll	- 40 -
3.3.1 Vor- und Nachbereitungszeit	- 40 -
3.3.2 Spenderdaten	- 40 -
3.3.3 Verfahrensdaten	- 42 -
3.4 Ablauf des Thrombopoetin-ELISAs	- 46 -
3.5 Evaluierung des Spenderkomforts	- 49 -
3.6 Evaluierung des Operatorenkomforts	- 50 -
3.7 Qualitätskontrolle	- 50 -
3.7.1 Allgemeines	- 50 -
3.7.2 Konzentratvolumen	- 52 -
3.7.3 Swirling und Aggregatbildung	- 52 -
3.7.4 Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase	- 53 -
3.7.5 Thrombozytenkonzentration und mittleres Plättchenvolumen	- 53 -
3.7.6 pH-Wert	- 54 -
3.7.7 Resterythrozyten	- 54 -
3.7.8 ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation	- 55 -
3.7.9 Thrombozytenaktivierung mittels CD62P	- 58 -
3.7.10 Restleukozyten	- 61 -
3.7.11 Sterilität	- 63 -
3.7.12 Citratgehalt	- 63 -
3.8 Gammabestrahlung	- 65 -
3.9 Thrombozytentransfusion und Berechnung des korrigierten Inkrements	- 65 -
3.10 Spender- und Verfahrensdaten der Thrombozytapheresespender des Blutspendedienstes am Universitätsklinikum des Saarlandes	- 67 -

3.11 Statistische Analyse.....	- 68 -
4. Ergebnisse	- 69 -
4.1 Vor- und Nachbereitungszeit	- 69 -
4.2 Spenderdaten	- 69 -
4.3 Verfahrensdaten	- 75 -
4.4 Evaluierung des Spenderkomforts	- 78 -
4.5 Evaluierung des Operatorenkomforts.....	- 79 -
4.6 Qualitätskontrolle	- 81 -
4.6.1 Allgemeines.....	- 81 -
4.6.2 Konzentratvolumen, Thrombozytenkonzentration, Plättchenzahl pro Einheit und mittleres Plättchenvolumen	- 81 -
4.6.3 Swirling, Aggregatbildung, pH-Wert und Citratgehalt	- 83 -
4.6.4 Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase	- 85 -
4.6.5 Resterythrozyten, Restleukozyten und Sterilität	- 86 -
4.6.6 Thrombozytenaktivierung mittels CD62P, ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation	- 87 -
4.6.7 Abweichungen von den Prüfkriterien für leukozytendepletierte Apherese-Thrombozytenkonzentrate	- 89 -
4.7 Thrombozytentransfusion und Berechnung des korrigierten Inkrements	- 90 -
4.8 Spender- und Verfahrensdaten der Thrombozytapheresespender des Blutspendedienstes am Universitätsklinikum des Saarlandes.....	- 93 -
5. Diskussion	- 94 -
5.1 Thrombozytapherese	- 94 -
5.1.1 Spenderdaten	- 94 -
5.1.2 Verfahrensdaten	- 99 -
5.1.2.1 Verfahrenszeit und verarbeitetes Blutvolumen.....	- 99 -
5.1.2.2 ACD-Verbrauch und ACD-Infusionsrate	- 100 -
5.1.2.3 Citratspezifische Nebenwirkungen	- 101 -
5.1.2.4 Sammlungsrate und Sammlungseffizienz	- 103 -
5.1.2.5 Gerätegenauigkeit	- 104 -
5.1.3 Spenderkomfort	- 105 -
5.1.4 Operatorenkomfort	- 106 -
5.2 Qualitätskontrolle	- 106 -
5.2.1 Thrombozytenkonzentration und mittleres Plättchenvolumen	- 107 -
5.2.2 Swirling und pH-Wert	- 108 -
5.2.3 Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase	- 109 -
5.2.4 Resterythrozyten, Restleukozyten und Sterilität	- 110 -
5.2.5 Thrombozytenaktivierung mittels CD62P und Thrombozytenaggregation	- 111 -
5.3 Thrombozytentransfusion und korrigiertes Inkrement.....	- 113 -
6. Literaturverzeichnis.....	- 115 -
7. Publikationen.....	- 127 -
8. Danksagung	- 128 -
9. Lebenslauf	- 129 -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bluttransfusion nach J. Blundell (Blundell J, 1828)	16 -
Abb. 2: Hauptbestandteile der Trima Accel	28 -
Abb. 3: Pumpen des Trima Accel-Systems (Bedienungsanleitung Trima Accel, Fa. CaridianBCT, 2008)	28 -
Abb. 4: Separationskanal des Trima Accel-Systems (Bedienungsanleitung Trima Accel, Fa. CaridianBCT, 2008)	29 -
Abb. 5: Leukozyten-Reduktions-System (Fortbildungsunterlagen Fa. Gambro BCT)	30 -
Abb. 6: Herstellung der Verdünnungsreihe zum Nachweis von humanem TPO (Produkt- information Quantikine® Human TPO Immunoassay, Fa. R&D Systems, 2009) .	47 -
Abb. 7: Standardkurve zur quantitativen Messung von TPO mit dem Photometer FLUOstar OPTIMA	49 -
Abb. 8: Überprüfung des Swirling-Phänomens	53 -
Abb. 9: Lichttransmission durch plättchenarmes Plasma und plättchenreiches Plasma vor und nach Zugabe eines Agonisten	56 -
Abb. 10: ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation (Labor-APACT-Aggregometer).....	57 -
Abb. 11: a) FSC/SSC-Darstellung des Leerwertes b) Punktwolkendiagramm des Leerwertes mit gesetztem Quadranten	60 -
Abb. 12: Punktwolkendiagramm: a) CD42a-FITC-Ansatz b) CD42b-PE-Ansatz	60 -
Abb. 13: Durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivierung mit CD42a-FITC- und CD62-PE-Antikörper.....	61 -
Abb. 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozytenzahl.....	62 -
Abb. 15: Vorwerte des Serum-Thrombopoetins bei den Tripel-Apherese-Spendern (n = 13) an den einzelnen Spendeterminen (Angaben in Klammern: Geschlecht, Körpergewicht in kg und BMI in kg/m ²)	73 -
Abb. 16: Vorwerte des Serum-Thrombopoetins bei den Doppel-Apherese-Spendern (n = 13) an den einzelnen Spendeterminen (Angaben in Klammern: Geschlecht, Körpergewicht in kg und BMI in kg/m ²)	74 -
Abb. 17: Evaluierung des Spenderkomforts	78 -
Abb. 18: Evaluierung des Spendeverfahrens	79 -
Abb. 19: Evaluierung des Operatorenkomforts.....	80 -
Abb. 20: Entwicklung des MPVs während der Lagerung.....	83 -
Abb. 21: Entwicklung des pH-Wertes während der Lagerung	85 -
Abb. 22: Entwicklung der ADP- und Kollagen-induzierten-Aggregation während der Lagerung.....	88 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Qualitätskontrollen für leukozytendepletiertes Thrombozytenkonzentrat (Richtlinien BÄK, 2010)	26 -
Tabelle 2: Mittlere Dichte einer Auswahl von Blutkomponenten (Council of Europe, 2000).....	27 -
Tabelle 3: Geräteeinstellung der Trima Accel	37 -
Tabelle 4: Untersuchung zur Tauglichkeit als Spender (Richtlinien BÄK, 2010).....	38 -
Tabelle 5: Citratspezifische Nebenwirkungen (McLeod-Kriterien nach Bueno JL et al., 2005).....	43 -
Tabelle 6: Thrombozytaphereseprotokoll getrennt nach der Apheresespende (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)	45 -
Tabelle 7: Überblick Qualitätskontrollen: Parameter, Methode, Gerät/ Hersteller und Tag der Qualitätskontrollen.....	51 -
Tabelle 8: Einteilung des Swirling-Phänomens (Dijkstra-Tiekstra MJ et al., 2004)	52 -
Tabelle 9: Vor- und Nachbereitungszeit bei der Tripel-Apherese-Spende	69 -
Tabelle 10: Spendercharakteristika (Geschlecht, AB0- und Rhesus-Blutgruppe)	69 -
Tabelle 11: Spendercharakteristika (Alter, Körpergewicht, Körpergröße, BMI, Gesamtblutvolumen)	70 -
Tabelle 12: Spendeabstand, hämatologische Vor- und Nachwerte der Spender.....	70 -
Tabelle 13: Vergleich hämatologischer Vor- und Nachwerte innerhalb der beiden Apherese-Gruppen (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese).....	71 -
Tabelle 14: Bildung der Differenz aus hämatologischen Vor- und Nachwerten (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)	72 -
Tabelle 15: Vorwerte des Serum-Thrombopoetins an den einzelnen Spendeterminen (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)	73 -
Tabelle 16: Verfahrensdaten (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese).....	75 -
Tabelle 17: Verfahrensdaten der Tripel-Apherese-Spenden	75 -
Tabelle 18: Citratspezifische Nebenwirkungen bei der Tripel-Apherese-Spende (McLeod-Kriterien nach Bueno JL et al., 2005)	76 -
Tabelle 19: Sammlungsrate, Sammlungseffizienz und Zeit für die Standarddosis der Tripel-Apherese-Spenden.....	77 -
Tabelle 20: Angaben zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel bei den Tripel-Apherese-Spenden.....	77 -
Tabelle 21: Qualitätskontrolle (Konzentratvolumen vor und nach Probenentnahme, PLT-Konzentration, PLT/ Einheit, MPV).....	82 -
Tabelle 22: Berechnung der Abnahme des Konzentratvolumens während der Lagerung unter Berücksichtigung der Probenentnahme	82 -
Tabelle 23: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung I.....	83 -
Tabelle 24: Qualitätskontrolle (Swirling, pH-Wert, Citrat)	84 -
Tabelle 25: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung II	84 -
Tabelle 26: Qualitätskontrolle (Glukose, Laktat, LDH)	86 -
Tabelle 27: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung III.....	86 -
Tabelle 28: Qualitätskontrolle (Resterythrozyten, Restleukozyten)	87 -
Tabelle 29: Qualitätskontrolle (CD62P, ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation)	87 -
Tabelle 30: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung IV.....	88 -
Tabelle 31: Patientencharakteristika	90 -
Tabelle 32: Transfusionsrelevante Parameter	91 -

Tabelle 33: Lagerungszeit der TKs vor Transfusion, hämatologische Vor- und Nachwerte und korrigiertes Inkrement der Patienten.....	- 92 -
Tabelle 34: Aufschlüsselung des korrigierten Inkrements nach 18 – 24 h (24h-CCI).....	- 92 -
Tabelle 35: Thrombozyten-Spendesituation der Universitätsklinik des Saarlandes.....	- 93 -
Tabelle 36: Spender- und Verfahrensdaten publizierter Arbeiten	- 95 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ad	zu
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikoagulans
ALL	akute lymphatische Leukämie
AMG	Arzneimittelgesetz
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
BÄK	Bundesärztekammer
BC	buffy coat
BMI	Body-mass-Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CCI	corrected count increment, korrigiertes Inkrement
CD	cluster of differentiation
CE	collection efficiency, Sammlungseffizienz
CIR	citrate infusion rate, Citratinfusionsrate
CL	Citratlyase
c-Mpl	Thrombopoetin-Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
CR	collection rate, Sammlungsrate
DIC	disseminated intravascular coagulation, disseminierte intravasale Gerinnung
DN	dual needle, Zweiarm-Verfahren
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin
et al.	et alii
Fa.	Firma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht

GBV	Gesamtblutvolumen
gg.	gegen
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GP	Glykoprotein
GMP	granule membrane protein
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HGF	hematopoietic growth factor, hämatopoetischer Wachstumsfaktor
HIV	human immunodeficiency virus, humanes Immundefizienzvirus
Hkt	Hämatokrit
HLA	human leucocyte antigen, humanes Leukozytenantigen
HPA	human platelet antigen, humanes Plättchenantigen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
incl.	inclusive
KOF	Körperoberfläche
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LL	lower left, unten links
LR	lower right, unten rechts
LRS	Leukozyten-Reduktions-System
Max.	Maximum
MDD	minimal detectable dose, kleinste messbare Dosis
MDH	Malatdehydrogenase
MGDF	megakaryocyte growth and development factor, Megakaryozytenwachstums- und Entwicklungsfaktor
Min.	Minimum
MPV	mittleres Plättchenvolumen
MW	Mittelwert
NADH/NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PADGEM	platelet activation-dependent granule-external membrane protein, aktivierungsabhängiges extern-granuläres Plättchenmembranprotein
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PE	Phycoerythrin
pH	potentia Hydrogenii
PLT	platelets, Plättchen
post-Hkt	Hämatokrit-Nachwert
post-MPV	Nachwert des mittleren Plättchenvolumens
post-PLT	Plättchen-Nachwert
post-TPO	Thrombopoetin-Nachwert
post-WBC	Leukozyten-Nachwert
PPP	platelet-poor plasma, plättchenarmes Plasma
PPR	percent platelet recovery, % korrigierte Wiederfindungsrate
prä-Hkt	Hämatokrit-Vorwert
prä-MPV	Vorwert des mittleren Plättchenvolumens
prä-PLT	Plättchen-Vorwert
prä-TPO	Thrombopoetin-Vorwert
prä-WBC	Leukozyten-Vorwert
PRP	platelet-rich plasma, plättchenreiches Plasma
PSGL	P-Selectin glycoprotein ligand, P-Selektin Glykoprotein Ligand
PSL	platelet storage lesion, Plättchenlagerungsschaden
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SCF	stem cell factor, Stammzellfaktor
SD	standard deviation, Standardabweichung
SN	single needle, Einarm-Verfahren
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
TFG	Transfusionsgesetz
TK	Thrombozytenkonzentrat
TMB	Tetramethylbenzidin
TPO	Thrombopoetin
TRALI	transfusion related acute lung injury, transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz

TSD	time for standard dose, Zeit für die Standardddosis
u.a.	unter anderem
UL	upper left, oben links
UR	upper right, oben rechts
VBV	verarbeitetes Blutvolumen
vs.	versus
vWF	von Willebrand-Faktor
WBC	white blood cells, Leukozyten
z.B.	zum Beispiel
zul.	zulässig

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Thrombozytenkonzentrate werden bei der Behandlung von Thrombozytopenien und Thrombozytopathien eingesetzt. Durch die demographische Entwicklung mit einem immer größer werdenden Anteil älterer Menschen, die zunehmende Rate an invasiven transfusionspflichtigen Eingriffen und die steigende Inzidenz an Tumorkranken, ist eine Steigerung der Produktivität bei Thrombozytapheresen von essentieller Bedeutung. In dieser Studie wurden Thrombozytapheresen mit unterschiedlichen Plättchenzielerträgen unter Verwendung des Zellseparators Trima Accel (CaridianBCT) durchgeführt.

Material und Methodik: Im Rahmen der Studie wurden 27 Thrombozytenspender rekrutiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Alle Studienteilnehmer der jeweiligen Gruppe durchliefen sechs konsekutive Spenden mit dem gleichen Plättchenzielertrag, wobei eine Vielzahl an Spender- und Verfahrensdaten erhoben wurden. Um eventuelle Auswirkungen der Thrombozytenspende auf das thrombopoetische System zu evaluieren wurde sowohl vor als auch nach der Apherese die Thrombopoetinkonzentration im Serum bestimmt. In einer Gruppe von 13 Spendern wurde während sechs aufeinander folgenden Apheresen pro Spender jeweils ein Doppel-Thrombozytenkonzentrat (Plättchenzielertrag $4,5 - 5,0 [\times 10^{11}]$) gewonnen. Der Mindestabstand zwischen zwei Spenden betrug in dieser Gruppe ≥ 14 Tage. In der anderen Gruppe von 14 Spendern wurde während der sechs konsekutiven Apheresen pro Spender jeweils ein Dreifach-Thrombozytenkonzentrat (Plättchenzielertrag $8,0 [\times 10^{11}]$) hergestellt. Zur Spendersicherheit wurde der Mindestabstand zwischen zwei Spenden in dieser Gruppe auf ≥ 21 Tage festgelegt und die Spender mussten vor allen sechs Spendeterminen eine Thrombozytenkonzentration $\geq 260/\text{nl}$ aufweisen. Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe der Dreifach-Thrombozytapherese unterschritt vor der zweiten konsekutiven Spende die Mindestthrombozytenkonzentration $\geq 260/\text{nl}$ und wurde daher von der weiteren Teilnahme an der Studie ausgeschlossen. Zur Evaluierung des Spenderkomforts bei der Dreifach-Thrombozytapherese nahmen die Studienteilnehmer am Ende der sechsten Apherese an einem standardisierten Interview teil. Außerdem wurden die an der Studie beteiligten Operatoren gebeten einen standardisierten Fragebogen bezüglich der Arbeit mit dem Zellseparator Trima Accel auszufüllen. Bei 48 Dreifach-Thrombozytapheresen wurden zusätzlich die Vor- und Nachbereitungszeit des Verfahrens dokumentiert. Desweiteren wurden in der Studie 46 Thrombozytenkonzentrate aus der Dreifach-Thrombozytapherese an 17 hämato-onkologische Patienten transfundiert und die klinische Wirksamkeit der Präparate anhand des korrigierten Inkrements (CCI) sowohl

nach 1 h als auch nach 18 – 24 h beurteilt. Weiterhin wurden an 40 Thrombozytenpräparaten, die mittels Dreifach-Thrombozytapherese hergestellt wurden, am Tag der Herstellung (Tag 1) sowie an Tag 5 und Tag 7 der Lagerung Qualitätskontrollen durchgeführt. Im Vorfeld der Studie wurden 910 Akten von verschiedenen Thrombozytenspendern, die in den vergangenen Jahren im Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin gespendet hatten, retrospektiv ausgewertet.

Ergebnisse: Die in beiden Gruppen nach Abschluss der Apherese gemessenen Thrombozytenkonzentrationen lagen bei allen Spenden nicht unter 100/nl. Es konnten in beiden Gruppen keine Veränderungen der Thrombopoetinkonzentration während der Apherese festgestellt werden. Außerdem ließen sich weder signifikante Veränderungen der Thrombopoetinkonzentration im Verlauf der sechs konsekutiven Spenden innerhalb der Gruppen, noch klare Abweichungen zwischen den beiden Gruppen aufzeigen. Die gemessene Verfahrenszeit zur Spende eines Dreifach-Thrombozytenkonzentrats lag im Durchschnitt 16 min über der einer Zweifach-Thrombozytapherese. Die Studienteilnehmer der Dreifach-Thrombozytapherese wiesen eine niedrige Inzidenz citratspezifischer Nebenwirkungen auf, die sich in der überwiegenden Zahl als leichte periorale Parästhesien äußerten. Der Spenderkomfort während der sechs konsekutiven Dreifach-Thrombozytapheresen wurde als durchweg positiv evaluiert. Die Qualitätskontrollen zeigten signifikante Veränderungen während der Lagerung in Hinsicht auf das mittlere Plättchenvolumen, das Swirling-Phänomen, den pH-Wert, die CD62P-Expression und die ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation. Desweiteren konnten die metabolischen Veränderungen im Verlauf der Lagerung in einem Glukoseverbrauch sowie in einem Anstieg der Laktat- und LDH-Konzentration aufgezeigt werden. Die im klinischen Teil der Studie durchgeführten Transfusionen offenbarten eine geringe Rate an Refraktärzuständen. Lediglich 25,6 % der Patienten wiesen nach 1 h eine Refraktärität auf (korrigiertes Inkrement $< 7,5$), bei 74,4 % der Patienten konnte eine erfolgreiche Transfusion beschrieben werden.

Schlussfolgerung: Unter Berücksichtigung bestimmter Mindeststandards ist eine Dreifach-Thrombozytapherese mit der Trima Accel in einer für den Spender zumutbaren Zeit und bei einer niedrigen Inzidenz von citratspezifischen Nebenwirkungen möglich. Die Prüfkriterien der Bundesärztekammer für leukozytendepletierte Thrombozytenkonzentrate wurden bei allen untersuchten Präparaten erfüllt. In der Studie konnte eine zufrieden stellende Wirksamkeit der mittels Dreifach-Thrombozytapherese gewonnenen Thrombozytenkonzentrate nach Transfusion aufgezeigt werden.

Safety and efficiency of triple-plateletpheresis as a standard procedure

Summary

Background: Platelet concentrates are being used to treat thrombocytopenias and thrombocytopathias. Considering the demographic development with a growing proportion of elderly people, the higher rate of invasive surgery requires transfusions as well as a higher incidence of patients with cancer, it is important to augment the productivity of plateletphereses. This study was looking at plateletphereses with varying platelet yields, using the cell separator Trima Accel (CaridianBCT).

Materials and Methods: In this study, 27 platelet donors were recruited and divided into two groups. All participants of each group underwent six consecutive donations with the same platelet yield, in which multiple data concerning the donor and the procedure were collected. In order to evaluate the possible effects of a platelet donation on the thrombopoietic system, the serum thrombopoietin concentration was determined before as well as after the apheresis. In a group of 13 donors a double platelet concentrate (platelet yield 4,5 – 5,0 [$\times 10^{11}$]) was collected from each donor during six consecutive aphereses. The minimum time in this group between two donations was ≥ 14 days. In the remaining group of 14 participants one triple platelet concentrate (platelet yield 8,0 [$\times 10^{11}$]) was produced from each donor on six consecutive aphereses. For the donor's safety it was required, that the minimum time in this group between two donations was ≥ 21 days and the donors had to show a platelet count $\geq 260/\text{nl}$ before all six donations. One participant in the group of the triple-plateletpheresis fell below the minimum platelet count $\geq 260/\text{nl}$ before his second consecutive donation and therefore dropped out from further participation in the study. For evaluation of the donor's comfort during triple-plateletpheresis all participants attended in a standardized interview at the end of the sixth apheresis. The operators involved in the study were also asked to complete a standardized questionnaire to give their opinion concerning the work with the cell separator Trima Accel. Additionally, in 48 cases of triple-plateletpheresis the preparation time and follow-up time of the procedure were documented. In this study also 46 platelet concentrates recruited out of triple-plateletpheresis were transfused to 17 haemato-oncology patients and the clinical efficiency to the platelet concentrates was evaluated after 1 hour as well as after 18 – 24 hours using the corrected count increment (CCI). Furthermore, 40 platelet concentrates derived from triple-plateletpheresis underwent a quality control on the day of production (day 1) as well as on day 5 and day 7 during storage. Before starting with the study, 910 records from different

platelet donors, who were involved in donation during previous years at the Institute of Haemostaseology and Transfusion Medicine, were evaluated retrospectively.

Results: In all donations of both groups the platelet count after completing apheresis was not below 100/nl. In both groups the thrombopoietin concentration showed no shifts during apheresis. Additionally, neither significant changes in thrombopoietin concentration during the six consecutive donations within the groups, nor clear differences between both groups were demonstrated. The measured processing time to donate a triple platelet concentrate was 16 minutes higher on average, as compared to double-plateletpheresis. The participants in triple-plateletpheresis showed a low incidence of citrate related side effects, which mainly resulted in slight perioral paraesthesia. The donor's comfort during the six consecutive triple-plateletphereses was evaluated as consistently positive. The quality controls showed significant changes during storage concerning the mean platelet volume, the swirling phenomenon, the pH-value, the CD62P-expression and the ADP- and Collagen-induced aggregation. In addition, the metabolic changes during storage were documented by a consumption of glucose as well as by a rise of lactate- and LDH-concentration. The transfusions in the clinical part of the study demonstrated a small rate of refractoriness. Only 25,6 % of the patients showed a refractoriness after 1 hour (corrected count increment $< 7,5$), 74,4 % of the patients underwent a successful transfusion.

Conclusion: While respecting certain minimal standards, it is possible to use a triple-plateletpheresis with the Trima Accel in an acceptable time frame for the donor and a low incidence of citrate related side effects. The criteria used by the German Bundesärztekammer for leucocyte-depleted platelet concentrates were fully covered for all products. This study was able to show a satisfied efficiency after transfusion for platelet concentrates obtained by triple-plateletpheresis.

2. Einleitung

2.1 Geschichte und Entwicklung der Transfusionsmedizin

Die Geschichte der Bluttransfusion entwickelte sich über viele Jahrhunderte. Blut galt seit jeher sowohl als Sitz des Lebens als auch des Bewusstseins. Schon zur Zeit von Hippokrates (ca. 460 – 370 v. Chr.) gibt es Überlieferungen, wonach Tierblut als Heilmittel für Epilepsie eingesetzt wurde (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Die eigentliche Entwicklung der Bluttransfusion begann im Jahr 1666 mit der ersten erfolgreichen Bluttransfusion von Hund zu Hund durch den englischen Arzt R. Lower (Lower R, 1666; Benedum J, 2001; Greenwalt TJ, 1997; Giangrande PLF, 2000; Walton MT, 1974; Webster C, 1971).

In Paris wurde, nach mehreren störungsfreien Bluttransfusionen an Tieren, am 15.06.1667 die erste Tierblutübertragung auf den Menschen durch den königlichen Leibarzt J. – B. Denis sowie den Chirurgen P. Emmerez durchgeführt. Der Patient überstand die Lammbluttransfusion ohne Komplikationen. Im selben Jahr führten Denis und sein Assistent mit Lamm- und Kalbsblut drei weitere Transfusionen durch, wovon zwei tödlich endeten. Dabei traten u.a. Schweißausbruch, Nasenbluten, Erbrechen, Nierenschmerzen und Hämaturie auf. Dies waren die ersten berichteten Transfusionsreaktionen. Durch diese Misserfolge wurden Bluttransfusionen von dem französischen Gerichtshof 1668 verboten (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

In Deutschland wurden die ersten Bluttransfusionen 1668 durch die Chirurgen M. Purmann und B. Kaufmann durchgeführt. Dem angeblich an Lepra erkrankten Patienten gaben sie mehrmals erfolgreich Blut eines Lammes (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Nach einer Pause von rund 100 Jahren wurden gegen Ende des 18. Jahrhunderts wieder die ersten Tierversuche zur Bluttransfusion durchgeführt. Der englische Physiologe und Geburtshelfer J. Blundell sah sich am Anfang des 19. Jahrhunderts durch den Blutungstod einer frisch Entbundenen dazu veranlasst, experimentelle Bluttransfusionen an Tieren durchzuführen. Durch diese Experimente erkannte er die Notwendigkeit der artgleichen Bluttransfusion, so dass dem Menschen nur menschliches Blut übertragen werden dürfte. Daraufhin führte er 1825 erstmals eine Bluttransfusion von Mensch zu Mensch durch. Er übertrug dabei erfolgreich Fremdblut auf eine postpartal ausgeblutete Frau. Blundell gilt daher als „Vater der modernen Transfusion“ (siehe Abb. 1) (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Young JH, 1964; Baskett TF, 2002; Blundell J, 1818).



Abb. 1: Bluttransfusion nach J. Blundell (Blundell J, 1828)

In Deutschland fand die wahrscheinlich erste Bluttransfusion von Mensch zu Mensch im Jahr 1828 durch G. A. E. Klett und E. W. Schrägle statt (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Der österreichische Pathologe K. Landsteiner lieferte 1901/1902 mit der Entdeckung der AB0-Blutgruppenmerkmale die wissenschaftliche Grundlage für eine erfolgreiche Bluttransfusion. Ihm war während seiner Arbeit aufgefallen, dass es zwischen Blutserum und Blutkörperchen verschiedener, anscheinend völlig gesunder Menschen, zu einer Agglutination kommt und vermutete, dass es sich bei dieser Agglutination um individuelle Eigenschaften des Blutes handeln könnte. Landsteiner entdeckte 1901 durch seine Beobachtungen vorerst drei Blutgruppen. Die Mitarbeiter Landsteiners, A. von Decastello und A. Sturli, erbrachten 1902 den Nachweis einer vierten Blutgruppe, die keine Isoagglutinine aufwies. Dabei handelte es sich um die heutige AB genannte Blutgruppe. Landsteiner schloss aus diesen Erkenntnissen, dass es zwei verschiedene Isoagglutinine geben müsse. Im Jahr 1928 wurden diese vier Blutgruppen durch die Hygienekommission des Völkerbundes zur international einheitlichen AB0-Blutgruppe deklariert. Für die Entdeckung dieser Blutgruppen und die daraus resultierende Grundlage einer gefahrlosen Anwendung der Bluttransfusion von Mensch zu Mensch erhielt Landsteiner 1930 den Nobelpreis für Medizin (Landsteiner K, 1931; Müller-Eckhardt C et al., 2004; Geserick G et al., 2001).

Einen weiteren großen Fortschritt verbuchte die Transfusionsmedizin 1924 in der Wiederentdeckung der Ungerinnbarmachung des Blutes mithilfe von Natriumcitrat. Diese Citratblutkonserven hatten eine Haltbarkeit bis zu einer Woche.

In den USA wurde 1919 im Rockefeller-Institut das erste Blutdepot gegründet, in dem größere Mengen Blut gelagert wurden. In Deutschland hingegen arbeitete man lange Zeit nur mit Frischblutübertragungen. Die ersten großen Blutspendernachweise wurden 1933 in Frankfurt/M., Berlin und Leipzig gegründet (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Wiebecke D et al., 2004).

Das Rhesus-Blutgruppensystem wurde 1940 von K. Landsteiner zusammen mit A. S. Wiener entdeckt (Landsteiner K et al., 1940).

Einen weiteren Fortschritt in der Transfusionsmedizin konnte durch die Entwicklung von ACD (Acid-Citrate-Dextrose) durch Loutit et al. und die damit verbesserte Gerinnungshemmung und Haltbarkeit der Blutkonserven erreicht werden (Loutit JF et al., 1943).

1952 konnten C. Walter und W. P. Murphy die ersten Kunststoffbeutel, bestehend aus Polyvinylchlorid, zur Blutkonservierung entwickeln. Diese Kunststoffbeutel lösten die zuvor verwendeten wiederverwendbaren Glasflaschen ab. Durch dieses geschlossene System konnten Verunreinigungen und daraus resultierende Komplikationen vermindert werden. Diese Kunststoffbeutel erleichterten zudem die Entwicklung der Komponententherapie. Durch die Komponententherapie war es möglich geworden, dem Patienten lediglich die Blutkomponente, die zuvor durch Zentrifugation hergestellt wurde, zuzuführen, die er auch wirklich benötigt. Die Transfusion von Vollblutkonserven ist heute weitgehend obsolet, da bei der Lagerung bestimmte Blutbestandteile wie Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren sehr schnell inaktiviert werden (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Die ersten Experimente mit Thrombozytenpräparaten fanden in den fünfziger Jahren statt. Bereits im Jahr 1910 berichtete W. W. Duke von dem Zusammenhang von Blutungen und einer verminderten Anzahl an Thrombozyten (Duke WW, 1910). Weitere wichtige Fortschritte konnten durch den Beginn der Hämapherese in den siebziger Jahren erreicht werden. Dadurch konnte die Patientensicherheit erhöht werden, da nun mit Zellseparatoren vermehrt Thrombozytenkonzentrate durch einen Spender gewonnen werden konnten. Diese Zellseparatoren trennen das Blut während der Spende in die einzelnen Blutkomponenten auf, wobei die nicht benötigten Blutbestandteile dem Spender zurückgegeben werden. Um die Rate von Alloimmunisierungen so niedrig wie möglich zu halten, wurden Leukozytenfilter entwickelt. Zudem wird dadurch das Transmissionsrisiko für das in Leukozyten enthaltene Cytomegalievirus (CMV) gesenkt (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Slichter SJ, 2007).

In Deutschland besteht zurzeit der größte Anteil des Spendeaufkommens aus Vollblutspenden. 2009 gab es insgesamt 4,86 Millionen Vollblutspenden. Die Zahl der Apheresespenden betrug im Jahr 2009 2,56 Millionen. Der größte Teil der Apheresespenden waren Plasma-

pheresen. Lediglich rund 9 % aller Apheresespenden wurden für die Gewinnung von Erythrozyten und Thrombozyten getätigt. Im Jahr 2009 wurden 520.000 TKs zur Transfusion freigegeben. Davon wurden 40 % aus Vollblut und 60 % durch maschinelle Apherese gewonnen. Es konnten pro Apherese durchschnittlich 1,8 Thrombozytenkonzentrate gewonnen werden (Henseler O et al., 2010).

Aufgrund der demographischen Entwicklung droht in Deutschland langfristig ein Mangel an Blutspendern. Nicht nur durch diese Tatsache, dass der Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung zunimmt, sondern auch durch die zunehmende Rate an invasiven transfusionsträchtigen Eingriffen und die steigende Inzidenz an Patienten mit Malignomen verstärkt sich diese Problematik, sodass ein Anstieg des Bedarfs an Blutspenden erwartet wird (Gross H, 2007; Greinacher A et al., 2007).

2.2 Thrombozyten: Aufbau, Funktion und Thrombopoese

Die kernlosen Thrombozyten stellen die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes dar. Sie haben einen Durchmesser von 1,5 – 3 μm . Die physiologische Thrombozytenzahl im Blut liegt zwischen 150.000 – 400.000/ μl (Kaushansky K, 2005).

Thrombozyten entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten. Durch Zytoplasmafragmentation entstehen aus dieser Vorläuferzelle die Blutplättchen. Auf diese Weise entstehen aus einem Megakaryozyten ca. 1000 – 4000 Thrombozyten. Die durchschnittliche tägliche Produktion beträgt 35×10^9 Plättchen pro Kilogramm Körpergewicht. Für einen durchschnittlichen Erwachsenen beträgt die tägliche Neuproduktion an Thrombozyten ca. 1×10^{11} (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Kaushansky K, 2005).

Insgesamt befinden sich etwa 70 % der Thrombozyten im peripheren Blut, das restliche Drittel befindet sich in der Milz (Milzpool). Die durchschnittliche Überlebenszeit der Blutplättchen beträgt ca. 7 – 10 Tage. Danach werden diese durch das retikuloendotheliale System in der Milz und Leber abgebaut. Im zirkulierenden Blut liegen die Blutplättchen in einer diskoiden Form vor (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Die Hauptaufgabe der Blutplättchen besteht in der Bildung von Thromben während der physiologischen Blutstillung. Sie können durch unterschiedliche Mechanismen die Blutstillung unterstützen. Bei einer Gefäßverletzung adhären Thrombozyten an den subendothelialen Strukturen und bilden so einen Thrombozytenpfropf. Außerdem leiten sie auf ihrer Membranoberfläche die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung ein und können mithilfe der aus den

Thrombozyten freigesetzten Inhaltsstoffe u.a. eine Vasokonstriktion bewirken (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Die Plättchen selbst können durch zwei verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Die Aktivierung von Thrombozyten kann entweder direkt durch Agonisten wie Serotonin, plättchenaktivierender Faktor (PAF), ADP, Thrombin, Thromboxan und Adrenalin über GTP-bindende G-Proteine, oder durch direkte Adhäsion an subendotheliale Strukturen, wie z.B. das Kollagen, erfolgen. Die Form der Thrombozyten ändert sich durch die Aktivierung. Sie liegen dann in einer spheroïden Form mit Pseudopodien vor. Die primäre Thrombozytenadhäsion an Gefäßwandstrukturen erfolgt durch den von Willebrand-Faktor (vWF) in der verletzten Gefäßwand und dem auf den Thrombozyten befindlichen Glykoprotein Ib (GP Ib). Diese Adhäsion bewirkt eine Thrombozytenaktivierung mit Bildung und Exozytose von Granula wie beispielsweise ADP und Thromboxan A₂, die wiederum eine weitere Thrombozytenaggregation induzieren (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Jurk K et al., 2008).

Blutplättchen enthalten drei morphologisch verschiedene Granula. Man unterscheidet zwischen den α -Granula, den δ -Granula und den Lysosomen. Eine Signalkaskade bewirkt die Aktivierung von Integrinen. Integrine stellen Membranrezeptoren dar und verbinden Liganden auf der Zelloberfläche mit dem Zytoskelett im Zellinneren. Im aktivierten Zustand bindet das Integrin GP IIb/IIIa durch eine Konformationsänderung u.a. Fibrinogen und den vWF, sodass ein stabiler Plättchenpfropf entsteht. Fibrinogen ist in der Lage, an zwei GP IIb/IIIa-Rezeptoren auf unterschiedlichen Thrombozyten zu binden und diese so querverzernetzen. Weiterhin kommt es zur explosionsartigen Bildung von Thrombin. Diese Protease bildet das blutstillende Fibrinnetz (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Jurk K et al., 2008).

Die Aktivierung von Thrombozyten wird durch mehrere regulatorische Substanzen geregelt. Hierbei spielt cAMP eine entscheidende Rolle. cAMP verhindert sowohl eine Thrombozytenaggregation als auch die Sekretion der Granula aus dem Inneren eines Thrombozyten (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Das P-Selektin („granule membrane protein“ GMP-140, „cluster of differentiation“ CD62P, „platelet activation-dependent granule-external membrane protein“ PADGEM) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 140 kDa und findet man vorwiegend in den α -Granula der Thrombozyten (André P, 2004; Stenberg PE et al., 1985). Erst nach Aktivierung der Blutplättchen wird es durch die Sekretion der Granula an die Zellmembran abgegeben und auf der Membran exprimiert. Das P-Selektin hilft bei der Bindung der Thrombozyten an neutrophile Granulozyten und Monozyten mit. Der Hauptligand des P-Selektins („P-Selectin glycoprotein ligand“ PSGL-1) ist daher auf Leukozyten zu finden. Des Weiteren ist das P-Selektin

auch auf Leukozyten exprimiert und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen nachweisbar. Eine lösliche Form des P-Selektins findet man im Blutplasma und stammt überwiegend von Thrombozyten (André P, 2004; Stenberg PE et al., 1985; Michelson AD et al., 1996; Dunlop LC et al., 1992; Vandendries ER et al., 2004). Dadurch dass das P-Selektin als Indiz für eine stattgefundene Plättchenaktivierung anzusehen ist, lässt sich, durch geeignete Antikörper in vitro, der Aktivierungsgrad der Thrombozyten bestimmen.

Während der Megakaryopoese wird auf den heranreifenden Thrombozyten das Antigen CD42a (GP IX) exprimiert. Das CD42a-Antigen gehört zur Familie der leuzinreichen Glykoproteine und bildet mit dem CD42b (GP Ib) und dem GP V ein Heterotrimer und ist für die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung essentiell. Das GP Ib ist der wichtigste Rezeptor für den vWF. Das GP IIb/IIIa dient hingegen nicht nur als Rezeptor für den vWF, sondern auch für Fibrinogen, Vitronektin und Fibronektin (Pötzsch B et al., 2010). Das CD42a-Antigen befindet sich somit auf ruhenden und aktivierten Blutplättchen und kann für die Bestimmung der Gesamtplättchenzahl verwendet werden.

Blutplättchen sind weiterhin als Abwehr- und Entzündungszellen tätig. Sie sind in der Lage, antimikrobielle Substanzen freizusetzen und können direkt mit Pathogenen wie Viren und Protozoen interagieren (Jurk K et al., 2008). Aus der Interaktion von Bakterien mit Blutplättchen, die entweder durch die direkte Bindung mit einem bakteriellen Surfaceprotein oder indirekt durch ein sich im Plasma befindliches Molekül zustande kommt, kann eine Aktivierung der Blutplättchen mit nachfolgender Thrombusentstehung resultieren (Fitzgerald JR et al., 2006). Plättchen enthalten eine Vielzahl an proinflammatorischen Chemokinen und Zytokine, die bei Aktivierung im Entzündungsbereich sezerniert werden und damit die Immunantwort beeinflussen (Hundelshausen P von et al., 2007).

Einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Thrombozytopoese im Knochenmark hat das Hormon Thrombopoetin (TPO), auch als „megakaryocyte growth and development factor“ (MGDF) bezeichnet. TPO besteht aus 353 Aminosäuren und wurde erstmals im Jahr 1994 isoliert (Kuter DJ, 2009; Jin F et al., 2004). Das Hormon TPO ist für die Bildung und Differenzierung der Megakaryozyten und damit für die Produktion von Thrombozyten zuständig. Es gibt eine Reihe weiterer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, wie z.B. IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-11, EPO, GM-CSF, LIF und SCF, die die Thrombozytopoese beeinflussen (Kaushansky K, 2009; Jelkmann W, 2001). Das Glykoprotein TPO wird in der Leber, der Niere sowie in den Stromazellen des Knochenmarks gebildet und hat ein Molekulargewicht von 95 kDa. Durch TPO werden die Megakaryozyten und ihre Progenitorzellen stimuliert, mehr Plättchen zu bilden und dadurch dem Blut mehr Blutplättchen zur Verfügung zu stellen.

Thrombozyten besitzen, ebenso wie Megakaryozyten und ihre Vorläuferzellen, auf ihrer Oberfläche einen TPO-Rezeptor (c-Mpl), mit dem sie das im Blut zirkulierende TPO binden können und es so aus dem zirkulierenden Blut entfernen. Nachdem TPO an seinen Rezeptor gebunden hat, wird der Komplex aus TPO und dem c-Mpl-Rezeptor internalisiert und abgebaut (McIntosh B et al., 2008; Kaushansky K, 2003; Li J et al., 1999; Kato T et al., 1998; Fielder PJ et al., 1996; Kaushansky K et al., 1994).

Der Plasmaspiegel an TPO korreliert umgekehrt proportional mit der Anzahl an Thrombozyten im Blut. Dies entspricht einem negativen Feedback, sodass bei sehr hoher Thrombozytenzahl eine niedrige Konzentration an TPO im Plasma nachweisbar ist, da ein großer Teil an TPO von den c-Mpl-Rezeptoren aus dem Plasma entfernt wird und entsprechend nur wenige Thrombozyten nachgebildet werden. Umgekehrt steigt die Konzentration von TPO bei einer Thrombozytopenie an, da nur eine kleine Menge an zirkulierendem TPO aus dem Plasma entfernt werden kann. Obwohl die Leber etwa die Hälfte des im Blut zirkulierenden TPOs synthetisiert, scheint die hepatische TPO-Produktion dieser Regulation nicht zu unterliegen (Kaushansky K, 2009; Jelkmann W, 2001). In mehreren Arbeiten konnte belegt werden, dass die in der Leber synthetisierte Menge an TPO unabhängig von der Thrombozytenzahl konstant bleibt. Die Angaben zum Mittelwert des im Plasma bzw. Serum enthaltenen TPOs bei gesunden Erwachsenen schwanken zwischen 20 – 240 pg/ml (McIntosh B et al., 2008; Jelkmann W, 2001; Koruk M et al., 2002).

2.3 Thrombozytenkonzentrate

2.3.1 Herstellung

Thrombozytenkonzentrate können entweder durch Zentrifugation aus Vollblutspenden oder durch eine maschinelle Thrombozytapherese gewonnen werden.

Bei der Herstellung aus Vollblutkonserven unterscheidet man zwei verschiedene Verfahren. Einmal das in den USA übliche Verfahren der Herstellung aus plättchenreichem Plasma (PRP-Verfahren) und das in Europa verbreitete Verfahren zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten aus dem „buffy coat“ (BC-Verfahren).

Beim dem PRP-Verfahren wird das gewonnene, mit Citrat versetzte, Vollblut langsam zentrifugiert („soft spin“) und danach der Überstand, also das plättchenreiche Plasma, in einen zweiten Kunststoffbeutel aufgefangen. Das plättchenreiche Plasma wird daraufhin in einem

zweiten Schritt nochmals zentrifugiert („hard spin“). Bei dieser Zentrifugation, die hochohrtig durchgeführt wird, sedimentieren die Thrombozyten basal und es entsteht plättchenarmes Plasma (PPP). Die Thrombozyten werden nach 1 – 2 h in einem Teil des gewonnenen plättchenarmen Plasmas wieder resuspendiert (Müller-Eckhardt C et al., 2004). Das durch PRP-Verfahren gewonnene Thrombozytenkonzentrat weist eine im Vergleich zum BC-Verfahren erhöhte Thrombozytenaktivierung auf (Vassallo RR et al., 2006a). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass das gewonnene Thrombozytenkonzentrat lediglich 60 – 90 % der in dem Vollblut vorhandenen Plättchen enthält. Zudem wirkt sich die erhöhte Volumenbelastung nachteilig aus (Salama A et al., 1998).

Bei dem BC-Verfahren wird zunächst eine erste hochohrtige Zentrifugation durchgeführt. Nachdem das Plasma und die Erythrozytenfraktion weitgehend entfernt wurden, wird der „buffy coat“ und die Restmenge an Plasma in einen zusätzlichen Kunststoffbeutel überführt. Als „buffy coat“ bezeichnet man eine Schicht, hauptsächlich bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, die sich durch Zentrifugieren von antikoaguliertem Vollblut zwischen den Erythrozyten und dem Plasma ausbildet. Der „buffy coat“ hat ein Gesamtvolumen von etwa 30 – 50 ml. Durch erneute Zentrifugation des thrombozyten- und leukozytenhaltigen „buffy coats“ setzen sich die verbliebenen Leukozyten und Erythrozyten von dem PRP ab.

Um ein Thrombozytenkonzentrat mit ausreichender Plättchenzahl herzustellen, verwendet man in der Regel 4 – 6 AB0-blutgruppengleiche „buffy coats“, die vor dem zweiten Zentrifugationsschritt in einen Beutel vereint werden („Pooling“). Man spricht dann von einem Pool-Thrombozytenkonzentrat (Müller-Eckhardt C et al., 2004; Richtlinien BÄK, 2010).

Mit Hilfe eines Leukozytendepletionsfilters lassen sich aus diesem leukozytendepletierte Pool-Thrombozytenkonzentrate herstellen. Durch die Reduzierung der in dem Konzentrat enthaltenen Leukozyten wird die Immunisierungsrate gegen HLA-Merkmale gemindert. Ein Pool-Thrombozytenkonzentrat enthält in Abhängigkeit von der Anzahl gepoolter Einheiten etwa $240 - 360 \times 10^9$ Thrombozyten, die in 200 – 350 ml Plasma oder Plasmaersatz-Lösung suspendiert sind (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

Mit der maschinellen Apherese durch Zellseparatoren besteht eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten. Die Herstellung erfolgt entweder durch direkte Thrombozytapherese oder durch eine Multikomponentenspende. Auch bei diesem Verfahren findet eine Leukozytendepletion statt, entweder schon während der Apherese durch einen integrierten Leukozytenfilter, oder erst im Anschluss an das Verfahren (Richtlinien BÄK, 2010). Bei diesem Verfahren wird das Blut des Spenders schon während der Spende durch Zentrifugation fraktioniert, die nicht benötigten Blutbestandteile werden dem Spender noch

während der Apherese zurückgegeben. Zur Antikoagulation wird ACD verwendet. Das Citrat ist ein Chelator und ist in der Lage, die für die Blutgerinnung essentiellen Ca^{2+} -Ionen zu binden. Die Zellseparatoren unterscheiden sich, in Abhängigkeit vom Hersteller, durch das verwendete Verfahren. Bei dem diskontinuierlichen Verfahren wird einem Spender ein bestimmtes Blutvolumen entnommen. Nachdem die Blutplättchen gesammelt wurden, werden die restlichen Blutbestandteile dem Spender wieder retransfundiert. Das dem Spender abgenommene Blutvolumen darf dabei höchstens 15 % des zirkulierenden Blutvolumens betragen (Müller-Eckhardt C et al., 2004). Durch das kontinuierliche Verfahren erfolgt die Gewinnung von Blutplättchen während der ständigen Entnahme einer kleinen Menge an Blut und der direkten Rückgabe der nicht benötigten Blutkomponenten. Die Spende kann dabei entweder im Einarm- oder auch im Zweiarm-Verfahren durchgeführt werden. Bei dem Einarm-Verfahren (SN-System) wird der Spender mit nur einer Nadel punktiert. Die Zellseparation teilt sich dadurch in eine Entnahmephase und eine Rückgabephase auf. Das Blut wird dabei über die gleiche Nadel aufgenommen und abgegeben. Für das Zweiarm-Verfahren (DN-System) werden entsprechend zwei Punktionsstellen benötigt. Eine Punktionsstelle ist für die Entnahme, die andere für die Rückgabe des Blutes vorgesehen. Durch die Thrombozytapherese kann ein Spender entweder ein Einfach-, Zweifach- oder ein Dreifach-Thrombozytenkonzentrat spenden. Ein Apherese-Thrombozytenkonzentrat enthält etwa $200 - 400 \times 10^9$ Thrombozyten in etwa 200 – 300 ml Plasma (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008; Müller-Eckhardt C et al., 2004).

In Deutschland werden jährlich etwa 150.000 Pool-TKs aus 620.000 Vollblutspenden hergestellt. Diese Vollblutspenden stammen von durchschnittlich 485.500 Spendern. Ein Thrombozytenspender hingegen spendet durchschnittlich ca. acht Apherese-TKs im Jahr. Die 150.000 Pool-TKs könnten daher auch von 18.750 Apherese-TK-Spendern geleistet werden. Daraus könnte die Spenderexposition für den Patienten signifikant verringert werden und ca. 37.000 l Plasma, die bei der Vollblut-Fraktionierung verloren gehen, eingespart werden (Hellstern P et al., 2007).

Durch die Verwendung von Citrat als Antikoagulans kann es bei der Spende von Apherese-TKs, bedingt durch den Abfall des Calciums im Blutserum, gelegentlich zu citratspezifischen Nebenwirkungen bei den Spendern kommen. Um diesen Nebenwirkungen entgegenzuwirken, kann die orale Gabe von Calcium indiziert sein (Schrezenmeier H et al., 2010).

Durch die Akkumulation von ACD im Blutkreislauf des Spenders und der daraus resultierenden sekundären Hypokalzämie kann eine neuromuskuläre Hyperexzitabilität resultieren, die sich in Parästhesien, Tremor oder Benommenheit äußern kann. Sowohl Übelkeit und Erbre-

chen als auch carpopedale Spasmen und Tetanien können bei einem weiteren Absinken des Calciumspiegels auftreten (Bueno JL, 2007; Strauss RG, 1996). Nach einer ACD-Infusion wird das aufgenommene Citrat in der Leber, den Nieren und den Muskeln metabolisiert, so dass das gebundene Calcium wieder freigesetzt werden kann. Weitere mögliche Citratreaktionen sind eine Verlängerung der QT-Zeit im EKG und Arrhythmien (Laspina SJ et al., 2002; Strauss RG, 1996).

Außerdem können als Folge einer Thrombozytapherese hypotensive Reaktionen, allergische Reaktionen sowie Thrombozytopenien auftreten. Da alle modernen Zellseparatoren Sensoren beinhalten, die Luft innerhalb des extrakorporalen Blutvolumens detektieren können, ist die Komplikation einer Luftembolie eine Rarität (Winters JL, 2006).

2.3.2 Lagerung und Haltbarkeit

Thrombozytenkonzentrate aus Apheresespenden befinden sich in einem sterilen, gasdurchlässigen Kunststoffbeutel aus Polyolefin. Sie befinden sich je nach Art der Herstellung in 100 % Spenderplasma oder in synthetischer Lösung (Plasmaersatzlösung, additive Lösung) mit einem Plasmaanteil von ca. 30 %. Weitere Bestandteile, in Abhängigkeit von dem Herstellungsverfahren, sind Antikoagulans, Stabilisator sowie geringe Mengen an Erythrozyten und Leukozyten. Um ein Funktionsverlust der Thrombozyten zu vermeiden, werden diese bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) aufbewahrt. Blutplättchen sind unter ständiger Agitation zu lagern und haben eine Haltbarkeit von maximal vier Tagen (4×24 h), gerechnet ab 24:00 Uhr des Entnahmetages. Um eine möglichst gute therapeutische Wirksamkeit zu erhalten, sollte die Lagerungsdauer von TKs relativ kurz sein und schnellstmöglich nach Eintreffen auf Station transfundiert werden (Richtlinien BÄK, 2010; Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

Die Thrombozyten sind bei der Gewinnung, während der Lagerung und dem Transport einer Vielzahl an mechanischen Reizen ausgesetzt. Zusätzlich spielen chemische und biochemische Reize, wie beispielsweise der pH-Wert, eine Rolle. Diese Reize sind in der Lage die Blutplättchen zu aktivieren und zu schädigen. Die biochemischen, strukturellen und funktionellen Veränderungen an den Blutplättchen und dem Thrombozytenkonzentrat während der Lagerung, werden unter dem Begriff „platelet storage lesion“ (PSL) zusammengefasst. Durch die Aktivierung der Thrombozyten während der Lagerung kommt es zu einem Funktionsverlust der Blutplättchen (Singh H et al., 2003; Dekkers DW et al., 2007).

Die in dem Thrombozytenpräparat enthaltene Glukose wird für Stoffwechselprozesse der Blutplättchen benötigt, sodass während der Lagerung eines TKs ein Glukoseverbrauch stattfindet.

Laktat ist ein Stoffwechselprodukt der anaeroben Glykolyse. Dabei katalysiert das Enzym LDH die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat. Ein starker Anstieg der Laktatkonzentration kann auf eine schlechte Sauerstoffversorgung des TKs hinweisen.

Die Laktatdehydrogenase ist ein Enzym, das sich im Zytoplasma aller Körperzellen befindet. Während der Lagerung eines Thrombozytenkonzentrats kommt es zu Zellschädigungen der Blutplättchen. Daraus resultiert ein Anstieg der LDH-Konzentration in dem TK. Somit lässt sich mithilfe der gemessenen LDH-Konzentration ein Rückschluss auf vorhandene Zellschädigungen der Thrombozyten ziehen.

Die Haltbarkeit von Plättchenpräparaten wird durch die mögliche bakterielle Kontamination, die durch die Lagerung bei Raumtemperatur begünstigt wird, limitiert (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

2.3.3 Qualitätskontrolle

Blutprodukte gehören zu den Arzneimitteln im Sinne von § 2 Absatz 1 Arzneimittelgesetz (AMG) und unterliegen den Vorschriften des Arzneimittelrechts. Neben dem AMG ist das Transfusionsgesetz (TFG) sowohl für die Herstellung als auch für die Anwendung von Blutprodukten maßgeblich (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

Qualitätskontrollen aus der laufenden Produktion sind vorgeschrieben und bei 1 % der hergestellten Thrombozytenkonzentrate, mindestens jedoch vier pro Monat, durchzuführen.

Zu den Prüfparametern zählen der Thrombozytengehalt, die visuelle Kontrolle, die Bestimmung von Restleukozyten und -erythrozyten, eine Sterilitätsprüfung, die Messung des pH-Wertes und das Volumen des Thrombozytenkonzentrats (Richtlinien BÄK, 2010).

Durch die Lagerung der Thrombozyten in einem Kunststoffbeutel werden diese aktiviert und gehen von einer diskoiden in eine sphärische Form über (Kaufman RM, 2006). Das Swirling-Phänomen entsteht, wenn Licht beim Durchtritt durch die diskoiden Plättchen gebrochen wird. Durch den Übergang der Thrombozyten in eine sphärische Form kommt es durch die Abnahme der Lichtstreuung zu einer Verringerung des Swirling-Phänomens in dem TK (Hervig T et al., 1999). Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Thrombozyten hat der pH-Wert des TKs.

Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die durchzuführenden Qualitätskontrollen incl. der Prüfkriterien und den Zeitpunkt der Evaluation.

Tabelle 1: Qualitätskontrollen für leukozytendepletiertes Thrombozytenkonzentrat (Richtlinien BÄK, 2010)

Prüfparameter	Prüfkriterium	Prüfzeitpunkt
Volumen	gemäß Spezifikation ^{#)}	nach Herstellung
Thrombozytengehalt	$> 2 \times 10^{11}$ /Einheit ¹⁾	nach Herstellung und am Ende der Haltbarkeit
Restleukozyten	$< 1 \times 10^6$ /Einheit ²⁾	nach Herstellung
Resterythrozyten	$< 3 \times 10^9$ /Einheit	nach Herstellung
pH-Wert bei 22 ± 2 °C	6,4 – 7,8 ³⁾	am Ende der Haltbarkeit
visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, „Swirling“, alle hergestellten Einheiten werden geprüft	alle hergestellten Einheiten werden am Ende der Haltbarkeit und vor Abgabe geprüft
Sterilität	steril	am Ende der Haltbarkeit

^{#)} 210 – 320 ml;

¹⁾ der Thrombozytengehalt der von der Spezifikation abweichenden Präparate darf den unteren Grenzwert höchstens um 5 % unterschreiten;

²⁾ die Restleukozytenzahl der von der Spezifikation abweichenden Präparate darf 1×10^7 pro Einheit nicht überschreiten;

³⁾ 90 % der Präparate müssen einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,6 aufweisen;

2.4 Präparative Thrombozytapherese

2.4.1 Prinzip der Thrombozytapherese

Die konventionelle Blutspende unterscheidet sich von der Hämapherese durch den Einsatz von Zellseparatoren mit einem extrakorporalen Kreislauf am jeweiligen Spender. Das Verfahren der Hämapherese kann zur Gewinnung von Plasmapräparaten, Granulozyten- und Erythrozytenkonzentraten, zur Sammlung von peripheren Blutstammzellen und Lymphozytenpräparaten sowie zur Gewinnung von Thrombozytenpräparaten angewandt werden. Ein Vorteil der Hämapherese besteht darin, dass die dabei nicht benötigten Blutbestandteile dem Spender wieder retransfundiert werden können.

Die Auftrennung der Blutkomponenten während des Aphereseverfahrens erfolgt dabei durch die Zentrifugation. Die Sedimentationsgeschwindigkeit mit der sich das Blut in die jeweiligen Blutbestandteile auftrennt, lässt sich aus folgender Gleichung berechnen (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

$$V = \frac{\frac{2}{9} \times W^2 \times [\delta_{Zellen} - \delta_{Plasma}] \times r^2}{n_t}$$

V = Sedimentationsgeschwindigkeit

W = Winkelgeschwindigkeit

δ = Dichte

r = Radius der Blutzellen

n_t = Viskosität des Mediums bei t °C

Anfänglich sedimentieren die Blutzellen nach ihrer Größe, erst danach reihen sich die einzelnen Blutkomponenten ihrer Dichte nach auf. Die Dichte der einzelnen Blutbestandteile nimmt dabei von den Erythrozyten zu den Leukozyten, Thrombozyten bis zum Blutplasma kontinuierlich ab. Tabelle 2 zeigt die mittlere Dichte einiger Blutkomponenten.

**Tabelle 2: Mittlere Dichte einer Auswahl von Blutkomponenten
(Council of Europe, 2000)**

Blutkomponente	Dichte in g/ml
Plasma	1,026
Thrombozyten	1,058
Monozyten	1,062
Lymphozyten	1,070
neutrophile Granulozyten	1,082
Erythrozyten	1,100

Für die unterschiedlichen Apheresegeräte gibt es Einmalkunststoffsets mit Separationskammern. In der Nähe der Punktionsstelle wird dem Spenderblut das Antikoagulans ACD im Verhältnis 1:8 – 1:12 beigemischt. Die Zellseparation erfolgt vollautomatisch und computer-gesteuert durch eine entsprechende Verfahrenssoftware (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

2.4.2 Überblick über den Zellseparator Trima Accel (CaridianBCT)

Das Blutkomponentensammelsystem Trima Accel (CaridianBCT, Lakewood, USA) separiert vollautomatisch das Spenderblut mithilfe einer Zentrifuge in seine Hauptkomponenten. Durch das Trima Accel-System können sowohl Thrombozytenkonzentrate als auch Plasma- und Erythrozytenkonzentrate gewonnen werden.

In Abb. 2 sind die Hauptbestandteile des Zellseparators gekennzeichnet. Die Präparatebeutel nehmen das gewonnene Produkt auf und sind Bestandteil des Einmalschlauchsets. Weitere

Bestandteile des Systems sind: der Sensorbildschirm, das Pumpensystem, die Zentrifuge und die Kassette, die als Teil des Schlauchsets die richtige Positionierung der einzelnen Schläuche vorgibt.

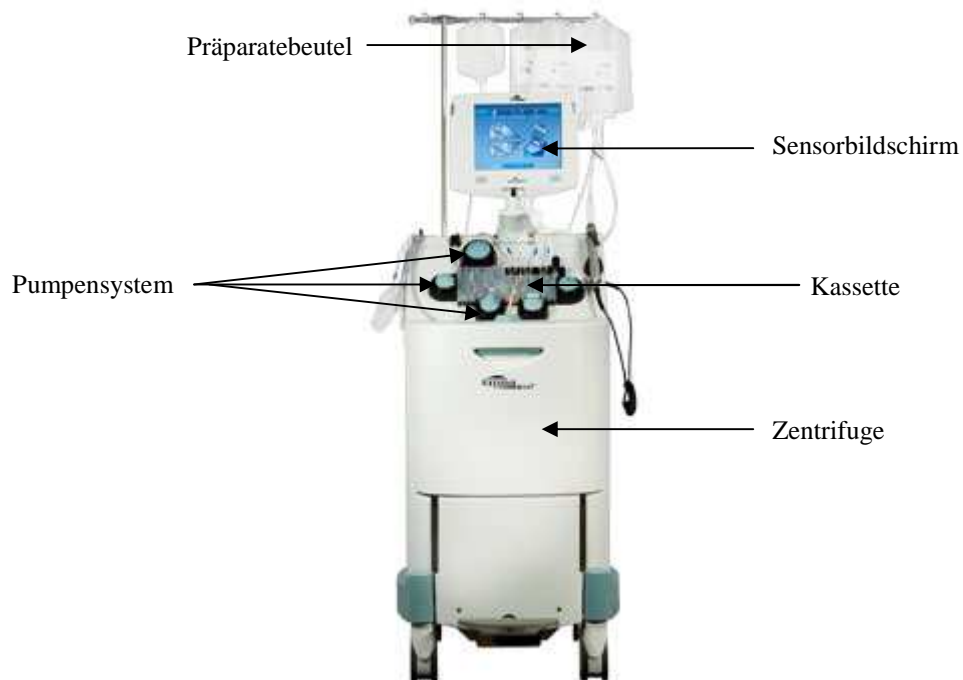
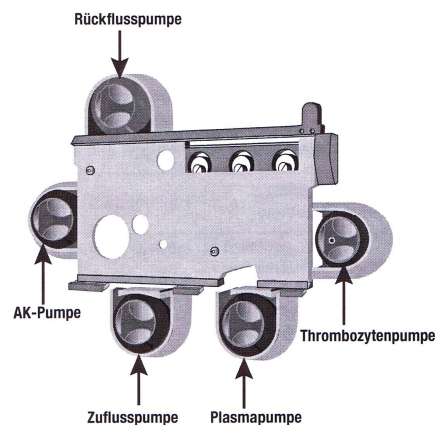


Abb. 2: Hauptbestandteile der Trima Accel

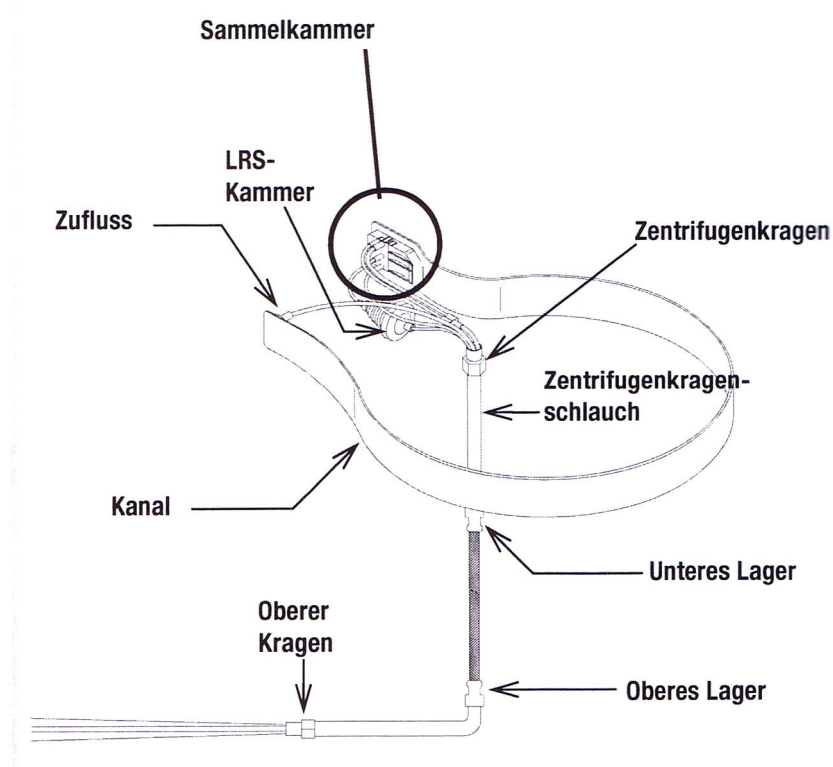
Das Sammelssystem verwendet fünf Pumpen: die Zufluss-, Antikoagulans- (AK-), Plasma-, Thrombozyten- und die Rückflusspumpe (Abb. 3).

Das Sammelverfahren findet ausschließlich im SN-System statt. Sowohl die Entnahme des Blutes als auch die Rückgabe erfolgen über dieselbe Nadel.



**Abb. 3: Pumpen des Trima Accel-Systems
(Bedienungsanleitung Trima Accel, Fa. CaridianBCT, 2008)**

Das entnommene Vollblut wird in der Nähe der Venenpunktionsstelle nach der Entnahme mit Antikoagulans versetzt. Das Blut-AK-Gemisch wird von der Zuflusspumpe über den Plastikschlauchkanal in den Separationskanal geleitet. Durch das Schwerfeld der Zentrifuge wird das Blut in seine Bestandteile aufgetrennt. Der Separationskanal besteht aus einem in der Zentrifuge rotierenden Kunststoffring. Abb. 4 zeigt den Separationskanal, der vor jedem Aphereseverfahren in die Füllvorrichtung der Zentrifuge eingelegt werden muss.

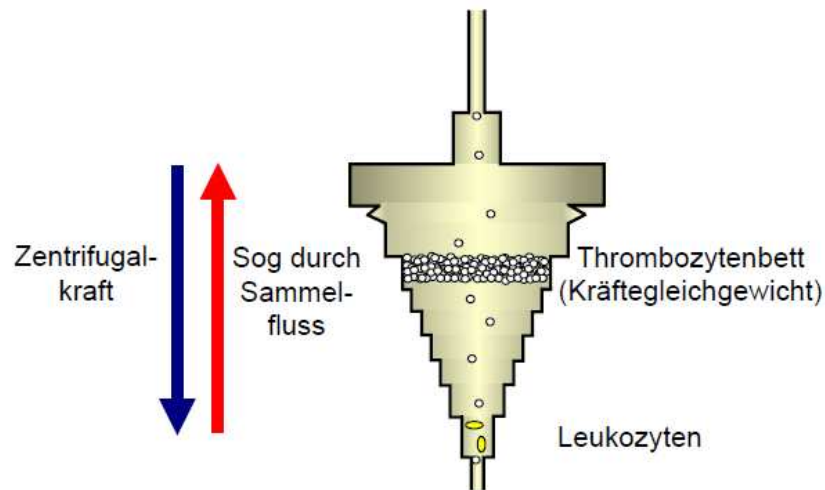


**Abb. 4: Separationskanal des Trima Accel-Systems
(Bedienungsanleitung Trima Accel, Fa. CaridianBCT, 2008)**

Durch die Plasma- und Thrombozytenpumpe werden das Plasma und die Thrombozyten abgepumpt. Die Erythrozyten werden durch den Druck, der durch den kontinuierlichen Zufluss des Spenderblutes zustande kommt, aus dem Kanal gedrängt.

Für die Herstellung leukozytendepletierter Apherese-TKs wird ein integriertes Leukozyten-Reduktions-System (LRS) verwendet. Dadurch kann die Kontamination des TK-Präparates mit Leukozyten auf ein Minimum reduziert werden. Das einströmende plättchenhaltige Plasma fließt aufsteigend in die Leukozytenreduktionskammer. Da der Radius der Kammer von unten nach oben zunimmt, nimmt die Durchschnittsgeschwindigkeit ab. Einströmende Blutplättchen werden auf einer bestimmten Höhe gehalten und bilden das Thrombozytenbett. Dieses Thrombozytenbett hat immer die gleiche Stärke. Leukozyten und Erythrozyten, die

eine größere mittlere Dichte als Thrombozyten aufweisen, befinden sich in der Leukozyten-reduktionskammer weiter unten. Es strömen immer mehr Blutplättchen in die Kammer auf, sodass die im Thrombozytenbett oben befindlichen Plättchen verdrängt werden und zusammen mit dem Plasma in die Präparatebeutel gelangen.



**Abb. 5: Leukozyten-Reduktions-System
(Fortbildungsunterlagen Fa. Gambro BCT)**

In Abhängigkeit von dem ausgewählten Verfahren, werden die Erythrozyten, Thrombozyten und das gesammelte Plasma entweder in den Präparatebeuteln gesammelt oder dem Rückflussreservoir zugeführt und durch die Rückflusspumpe an den Spender zurückgegeben.

Die Zuflusspumpe hat während der Sammelphase von Thrombozyten und Plasma eine konstante Geschwindigkeit. Dadurch, dass eine geringe Menge des zurückfließenden Blutes erneut in den Zuflussschlauch geleitet wird, kann ein kontinuierlicher Blutfluss im Kanal aufrechterhalten werden. Somit ist das Trima Accel-System, obwohl sich Entnahme- und Rückgabephase in diesem Einarm-Verfahren abwechseln, ein Beispiel für ein prinzipiell kontinuierliches Separationsverfahren.

Enthält das Rückflussreservoir ein ausreichend großes Volumen, wird die Rückflusspumpe aktiviert und die nicht benötigten Blutbestandteile an den Spender zurückgeführt.

2.5 Thrombozytentransfusionen

2.5.1 Indikationen

Thrombozytenkonzentrate können bei der Behandlung von Thrombozytopenien oder Thrombozytopathien indiziert sein. Die Indikationsstellung ist abhängig von der Thrombozytenzahl und der Plättchenfunktion, der Blutungssymptomatik, dem Blutungsrisiko und der jeweiligen Grunderkrankung.

Bei Malignom-Patienten mit einer Thrombozytenzahl $< 20/\text{nl}$ und weiteren Blutungsrisiken wird eine TK-Transfusion als indiziert angesehen (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

Die primäre oder sekundäre Knochenmarksinsuffizienz stellt eine der wichtigsten Indikationen für eine Transfusion von Thrombozyten dar.

Bei der Anwendung von Thrombozytenkonzentraten unterscheidet man die therapeutische Thrombozytentransfusion, bei der die Transfusion zur Behandlung einer manifesten Blutung eingesetzt wird, von der prophylaktischen Transfusion, die das Auftreten von Blutungen verhindern soll. Bei der primären und sekundären Knochenmarksinsuffizienz werden solche prophylaktische Thrombozytensubstitutionen häufig als sinnvoll erachtet (Salama A et al., 1998).

Bei akuten Blutungen wird eine Substitution bei einer Plättchenkonzentration von $< 100/\text{nl}$ angestrebt. Patienten ohne zusätzliche Blutungsrisiken wird vor invasiven Eingriffen ab einer Thrombozytenzahl von $< 50/\text{nl}$ eine Thrombozytentransfusion empfohlen. Blumberg et al. weisen darauf hin, dass die Grenze $< 50/\text{nl}$ lediglich auf Expertenmeinung basiert und überflüssige Transfusionen ohne zusätzlichen Nutzen daraus resultieren können (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008; Blumberg N et al., 2010).

2.5.2 Wirksamkeitskriterien und Refraktärzustand

Nach einer Transfusion von Thrombozytenkonzentraten verteilen sich die Blutplättchen im Blut und in der Milz. Die Wiederfindungsrate („recovery“) im peripheren Blut liegt daher lediglich bei 60 – 70 %. Bei fehlender Milz ist die Wiederfindungsrate höher, bei einer Splenomegalie hingegen lassen sich nach einer TK-Transfusion weniger Blutplättchen im peripheren Blut nachweisen und die „recovery“ fällt entsprechend geringer aus. Nach einer Splen-

ektomie beträgt die „recovery“ über 90 % (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008; Slichter SJ, 2007).

Es gibt eine Reihe weiterer Einflussfaktoren, wie Sepsis und Fieber, manifeste Blutungen, Verbrauchskoagulopathien, HLA-Antikörper und plättchenschädigende Medikamente, die den Verbrauch an Blutplättchen erhöhen. Die mittlere Überlebenszeit der Thrombozyten nimmt mit zunehmender Lagerungsdauer ab (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

Die Evaluierung des Therapieerfolges von Thrombozytenkonzentraten mithilfe klinischer Kriterien, wie die Bestimmung der Blutungszeit, ist weitgehend obsolet.

Daher überprüft man beim Empfänger die Wirksamkeit einer Blutplättchentransfusion durch die Ermittlung des Anstiegs der Plättchen im peripheren Blut. Dieser Anstieg der Blutplättchen wird als Inkrement bezeichnet. Durch die Gabe einer therapeutischen Einheit wird mit einem Inkrement von 20 – 40/nl gerechnet (Müller-Eckhardt C et al., 2004).

Das korrigierte Inkrement (CCI) berücksichtigt zudem die Abhängigkeit des Inkrements von dem Blutvolumen des Empfängers und der Dosis transfundierter Thrombozyten. Das CCI stellt somit eine normalisierte Maßzahl dar und wird entweder innerhalb der ersten Stunde nach Transfusion (1h-CCI) oder nach 18 – 24 h (24h-CCI) bestimmt (Heckman KD et al., 1997).

Der Anstieg der Thrombozyten lässt sich auch als % korrigierte Wiederfindungsrate („percent platelet recovery“, PPR) angeben. Diese Formel berücksichtigt den Milzspeicher (Slichter SJ, 2007; Davis KB et al., 1999).

Ist bei wiederholten Transfusionen von AB0-kompatiblen und funktionsfähigen Thrombozyten kein Anstieg der Thrombozytenkonzentration und somit des korrigierten Inkrements festzustellen, liegt ein Refraktärzustand (Refraktärität) vor. Eine international einheitliche Definition der Refraktärität mit entsprechenden Referenzwerten liegt nicht vor. In der vorliegenden Studie wird bei einem 1h-CCI < 7,5 und bei einem 24h-CCI < 4,5 von einem Refraktärzustand ausgegangen (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008; Delaflor-Weiss E et al., 2000).

Die Ursachen der Refraktärität werden in immunologische und nicht-immunologische Ursachen unterteilt. Immunologische Ursachen werden vor allem durch im Empfänger vorhandene Alloantikörper hervorgerufen. Durch die vorgeschriebene Verwendung leukozytendepletierter Thrombozytenkonzentrate ist die Alloimmunisierungsrate gering. Daher kommen für eine Refraktärität eher nicht-immunologische Ursachen in Betracht.

2.5.3 Nebenwirkungen

In der Studie von Heddle et al. traten bei der Gabe von TKs (n = 1190) durchschnittlich in 13,6 % aller Fälle Transfusionsreaktionen auf (Heddle NM et al., 2002).

Durch die Lagerung der Thrombozytenkonzentrate bei Raumtemperatur besteht die Gefahr der bakteriellen Kontamination des Produkts und der Auslösung einer Bakteriämie bzw. Sepsis beim Empfänger (Slichter SJ, 2007). Die Inzidenz von Transfusionsreaktionen aufgrund einer Bakterienbesiedlung des TKs liegt derzeit zwischen 1:900 und 1:100.000 (Walther-Wenke G, 2008).

Nicht-hämolytische febrile Transfusionsreaktionen konnten durch die Herstellung leukozyten-depletierter Produkte und der Beimischung von Additivilösungen verringert werden und sind daher nur noch sehr selten (< 0,1 %) zu beobachten. Es treten während oder innerhalb der ersten Stunde nach der Transfusion eines TKs febrile Reaktionen mit einem Temperaturanstieg > 1 °C auf. Auslöser können HLA-Antikörper der Empfänger gegen die Leukozyten des Spenders und inflammatorische Zytokine aus Leukozyten und Blutplättchen, die im TK enthalten sind, sein (Heddle NM et al., 2002; Eichler H et al., 2001; Slichter SJ, 2007; King KE et al., 2004; Paglino JC et al., 2004; Yazer MH et al., 2004).

Allergische Transfusionsreaktionen verlaufen überwiegend milde und können durch die zusätzliche Gabe von Antihistaminika abgeschwächt werden (Eichler H et al., 2001). Als Auslöser allergischer Transfusionsreaktionen werden Antikörper im Serum des Empfängers gegen die Plasmaproteine des Spenders angenommen (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

Die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) ist eine seltene, aber schwerwiegende Komplikation durch die TK-Gabe. Diese Transfusionsreaktion kann zur Beatmungspflichtigkeit des Patienten führen. Die TRALI wird durch leukozytenreaktive Antikörper im Spenderplasma, selten im Empfängerplasma, ausgelöst. Die aktivierten Leukozyten verlegen die Mikrozirkulation der Lunge und verursachen ein Lungenödem. Selten wird eine TRALI auch nicht-immunogen ausgelöst (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008). In bis zu 25 % der Fälle versterben die Patienten (Gilstad CW, 2003; Kopko PM et al., 1999).

Das Übertragungsrisiko für HIV, HBC und HCV durch Thrombozytenkonzentrate ist zwar sehr gering, jedoch nicht völlig auszuschließen (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Thrombozytapherese werden heutzutage in der Regel Doppel-Thrombozytenkonzentrate gewonnen. Durch eine stetige Verbesserung der Zellseparatoren ist es möglich geworden, auch Dreifach-Thrombozytenkonzentrate während einer Sitzung von einem Spender herzustellen.

Die Studie ist als longitudinale multi-interventionelle Studie konzipiert. In der Studie soll geklärt werden, ob es möglich ist, die Dreifach-Thrombozytapherese unter Wahrung der Spendersicherheit als Routineverfahren im Blutspendedienst der Universitätsklinik des Saarlandes einzuführen. Alle Apheresen werden mit dem Zellseparator Trima Accel der Fa. CaridianBCT durchgeführt.

Ziel der Studie ist es, mithilfe einer ersten Gruppe an Thrombozytenspendern eine Vielzahl relevanter Daten wie Aphereseparameter, bestimmte Laborwerte vor und nach der Spende, evtl. auftretende Nebenwirkungen sowie Angaben des Zellseparators zur Berechnung der Gerätegenauigkeit zu evaluieren. Alle Spender aus dieser Gruppe spenden nach einem vorher festgelegten zeitlichen Mindestabstand an sechs aufeinander folgenden Spenden jeweils ein Dreifach-Thrombozytenkonzentrat (Tripel-Apherese).

Ein Teil dieser Daten aus der Dreifach-Thrombozytapherese soll mit Daten aus einer zweiten Gruppe von Spendern verglichen werden, die zwar ebenfalls an sechs konsekutiven Thrombozytenspenden teilnehmen, jedoch lediglich ein Doppel-Thrombozytenkonzentrat spenden (Doppel-Apherese).

Die Probanden aus der Tripel-Apherese-Gruppe werden am Ende der Studie an einem standardisierten Interview zum Spenderkomfort teilnehmen.

Ein standardisierter Fragebogen wird an die Operatoren ausgeteilt, um eine Bewertung bezüglich der Zufriedenheit der Operatoren mit dem Trima Accel-Sammelsystem zu erhalten.

Zudem werden in dieser Studie Qualitätskontrollparameter aus der Dreifach-TK-Spende erhoben, um dieses Verfahren bei der Zulassungsbehörde genehmigen zu lassen.

Ein Teil der Thrombozytenkonzentrate aus der Dreifach-TK-Spende soll zudem an hämatologische Patienten transfundiert werden, um mithilfe des korrigierten Inkrements die klinische Wirksamkeit der Thrombozytenpräparate aus der Dreifach-TK-Spende nachzuweisen.

3. Material und Methodik

3.1 Studiendesign und Spenderauswahl

Insgesamt wurden in der vorliegenden Studie 27 Thrombozytenspender rekrutiert. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die Spender mehr als fünf Vorspenden aufwiesen. Die Feststellung der Spendetauglichkeit erfolgte nach den aktuell geltenden Richtlinien der BÄK zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinien BÄK, 2010).

Die Rekrutierung geeigneter Spender dauerte vom 06.07.2009 bis zum 22.07.2009, die letzte Thrombozytapherese im Rahmen der Studie fand am 10.12.2009 statt. Die Thrombozytapheresen wurden allesamt mit dem Trima Accel-System (CaridianBCT) durchgeführt.

In eine erste Gruppe wurden 14 Thrombozytenspender aufgenommen. Diese Thrombozytenspender spendeten an sechs konsekutiven Spenden immer ein Dreifach-TK (Plättchenzielertrag $8,0 [\times 10^{11}]$). Der Mindestabstand zwischen zwei Spendeterminen betrug 21 Tage. Zur Spendersicherheit wurde im Vorfeld der Studie die Mindestthrombozytenkonzentration, die ein Spender vor der Dreifach-TK-Spende im peripheren Blut aufweisen muss, mit $\geq 260/\text{nl}$ festgelegt. Diese Voraussetzung mussten alle Spender dieser Gruppe vor jedem Spendetermin erfüllen. Bei den Spendern wurde, sofern dies möglich war, bei allen sechs Spenden ein identischer Venenzugang verwendet. Von den drei gewonnen TKs wurden zwei für den Vertrieb freigegeben und ein Präparat für die Durchführung von Qualitätskontrollen zurückbehalten. Nach den sechs Tripel-Apheresen wurden die Spender mithilfe eines standardisierten Interviews um die Bewertung dieses Verfahrens gebeten.

Die an diesem Teil der Studie teilnehmenden Spender wurden im Vorfeld über das Verfahren aufgeklärt und auf das möglicherweise verstärkte Auftreten citratspezifischer Nebenwirkungen und die längere Verfahrenszeit hingewiesen. Von jedem Spender lag eine schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie vor.

An einem Teil der Thrombozytenpräparate ($n = 40$) aus der Tripel-Apherese wurden eingehende Qualitätskontrollen durchgeführt.

Zudem wurde eine bestimmte Anzahl der gewonnenen TKs ($n = 46$) aus der Tripel-Apherese an hämato-onkologische Patienten transfundiert. Die Wirksamkeit der transfundierten TKs wurde sowohl durch das 1h-CCI als auch durch das 24h-CCI beurteilt. Die Patienten wurden vor der Transfusion mithilfe eines Aufklärungsbogens über die Studie aufgeklärt und befragt,

ob sie an der Studie teilnehmen möchten. Von jedem Patienten lag eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie vor.

Die an der Studie beteiligten Operatoren wurden am Ende der Studie gebeten, einen standardisierten Fragebogen über die Zufriedenheit im Umgang mit dem verwendeten Trima Accel-Sammelsystem zu beantworten.

In eine zweite Gruppe wurden 13 Spender aufgenommen. Für die Spender dieser Gruppe galt die normalerweise nach den Richtlinien übliche Mindestthrombozytenkonzentration vor der Thrombozytenspende von $\geq 150/\text{nl}$ (Richtlinien BÄK, 2010). Diese Spender wurden gebeten, an sechs konsekutiven Spenden jeweils ein Doppel-TK zu spenden (Plättchenzielertrag $4,5 - 5,0 [\times 10^{11}]$). Der Mindestabstand zwischen zwei Doppel-Apheresen betrug 14 Tage. Die dabei erfassten Spender- und Verfahrensdaten wurden mit denen aus der Gruppe der Tripel-Apherese verglichen.

Im Vorfeld der Studie wurden Akten von $n = 910$ Thrombozytenspendern des Blutspendedienstes am Universitätsklinikum des Saarlandes ausgewertet. Ziel dieser retrospektiven Datenerfassung war es, den durchschnittlichen Thrombozytenabfall im Spenderblut während der Thrombozytapherese zu evaluieren. Die statistische Analyse dieser gesammelten Daten wurde für die Festlegung der Mindestthrombozytenkonzentration bei der Tripel-Apherese-Spende im Vorfeld der Studie berücksichtigt.

Für die durchgeführte Studie lag ein zustimmendes Votum der lokalen Ethikkommission vor.

3.2 Durchführung der Thrombozytenspende

Das Trima Accel-System wurde mit der Softwareversion 5.1 betrieben. Die in der Tabelle 3 aufgelisteten Geräteeinstellungen wurden im Vorfeld der Studie für alle verwendeten Apheresegeräte ($n = 4$) vorgenommen. Es wurden keine weiteren Modifikationen an den Geräteeinstellungen durchgeführt, sodass alle im Rahmen der Studie abgelaufenen Apheresen mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Geräteeinstellungen stattfanden.

Erläuterungen zu den verwendeten Geräteeinstellungen (die Angaben in Klammern zeigen den Wertebereich der gültigen Eingaben):

- AK-Infusions-Steuerung: Infusionsrate, mit der dem Spender das Antikoagulant gegeben wird (1 – 6).

- Entnahmefluss-Steuerung: Entnahmeflussrate kann anhand des Gesamtblutvolumens des Spenders eingeschränkt werden und arbeitet mit der Einstellung max. Entnahmefluss zusammen (1 – 6).
- Rückfluss-Steuerung: Rückflussrate kann anhand des Gesamtblutvolumens des Spenders eingeschränkt werden und arbeitet mit der Einstellung max. Rückfluss zusammen (1 – 6).
- Max. Entnahmefluss: Geschwindigkeit mit der einem Spender Blut abgenommen wird (schnell: 142 ml/min, mittel: 120 ml/min, langsam: 100 ml/min).
- Rückflussdruck Maximum: maximal zul. Rückflussdruck (100 – 310 mmHg).
- Entnahmedruck Maximum: maximal zul. Entnahmedruck (100 – 250 mmHg).
- Blut/ AK-Verhältnis: AK-Menge, die während der Apherese im Schlauchset mit dem Blut vermischt wird (6,0 – 13,7 :1).
- Einfach-TK-Volumen: Volumen eines TK-Einzelpräparates, das die gesammelten Blutplättchen, incl. Plasma und AK-Menge enthält (entsprechend der Zulassung des Herstellers).
- Konzentration an Plättchen im Produkt: Anzahl der Blutplättchen pro μl des mit den Thrombozyten gesammelten Plasmas ($500 - 6000 \times 10^3/\mu\text{l}$).
- Ertrag: Menge zu sammelnder Thrombozyten ($1 - 15 \times 10^{11}$).
- Ertragsbestimmungsfaktor: Kalibrierung des Thrombozytenertrages, sodass 50% der Thrombozytenpräparate den im Bildschirm „Verfahrenszusammenfassung“ angezeigten Ertrag erfüllen oder übertreffen (0,50 – 1,50).

Tabelle 3: Geräteeinstellung der Trima Accel

Parameter	Einstellung
AK-Infusions-Steuerung	6
Entnahmefluss-Steuerung	4
Rückfluss-Steuerung	1
Max. Entnahmefluss	mittel (120 ml/min)
Max. Rückflussrate	wird automatisch durch die Software des Gerätes festgelegt
Max. Zuleitungsrate	wird automatisch durch die Software des Gerätes festgelegt
Rückflussdruck Maximum [mmHg]	250
Entnahmedruck Maximum [mmHg]	- 250
Blut/ AK-Verhältnis	11:1
Einfach-TK-Volumen [ml]	220 (Tripel-Apherese) vs. 225 – 250 (Doppel-Apherese)
Konzentration an Plättchen im Produkt [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	1212 (Tripel-Apherese) vs. 1000 (Doppel-Apherese)
Ertrag [$\times 10^{11}$]	8,0 (Tripel-Apherese) vs. 4,5 – 5,0 (Doppel-Apherese)
Ertragsbestimmungsfaktor	1,0

Vor jeder Spendeentnahme wurde durch Anamnese, eine orientierende körperliche Untersuchung und durch Überprüfung einzelner Laborparameter die Spendetauglichkeit von einem Arzt festgestellt. Tabelle 4 zeigt eine Auflistung bestimmter Prüfkriterien, anhand derer die Spendetauglichkeit im Rahmen der Studie beurteilt wurde.

Tabelle 4: Untersuchung zur Tauglichkeit als Spender (Richtlinien BÄK, 2010)

Kriterium	Anforderungen
Hämoglobin oder Hämatokrit im Spenderblut	Frauen: Hb \geq 125 g/l oder Hkt \geq 0,38 Männer: Hb \geq 135 g/l oder Hkt \geq 0,40
Alter	18 – 68 Jahre
Körpergewicht	mindestens 50 kg
Blutdruck	systolisch: 100 – 180 mmHg diastolisch: unter 100 mmHg
Puls	unauffällig, Frequenz 50 – 110/min
Temperaturmessung	kein Fieber
Gesamteindruck	keine erkennbaren Krankheitszeichen
Haut an der Punktionsstelle	frei von Läsionen

Das Aphereseset wurde kurz vor der eigentlichen Apherese in den Zellseparator eingelegt. Die dafür benötigte Zeit wurde dokumentiert. Als Antikoagulans wurde ACD-A (Frekaflex ACD-A, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verwendet.

Vor der Punktion einer geeigneten Vene wurde die Punktionsstelle desinfiziert. Zunächst wurde die Punktionsstelle mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel (Softasept® N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und einem sterilen Wattetupfer gereinigt. Danach wurde das gleiche Desinfektionsmittel erneut aufgetragen und mit der Punktion mindestens 30 s gewartet.

In das Spendemenü des Trima Accel-Systems wurden die aktuellen Spenderinformationen (Körpergröße, Körpergewicht, Geschlecht und die Blutgruppe) eingegeben. Zudem mussten die aktuelle Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut und der Hämatokrit-Wert einprogrammiert werden. Da das Aphereseverfahren noch vor der eigentlichen Messung des Blutbildes gestartet wurde, wurden zunächst die vor der letzten Spende gemessenen Blutwerte eingegeben.

Nach erfolgreicher Venenpunktion wurde der Blutprobenbeutel, der sich an dem Kunststoffschlauchsystem des Apheresesets befindet, mit mindestens 15 ml des initialen Blutvolumens befüllt und für die Labordiagnostik (Blutbild, Blutgruppe, HIV, HBV, HCV, CMV, Syphilis) verwendet. Nach dem Befüllen des Blutprobenbeutels wurde dieser von dem Kunststoffschlauchsystem des Apheresesets steril abgeschweißt (Handschweißgerät Mobilea, Fa. Fresenius Kabi), das entsprechende Sammelverfahren mit dem gewünschten Thrombozyten-

ertrag ausgewählt und die Apherese gestartet. Für die Gruppe der Doppel-Apherese-Spender wurde ein Plättchenzielertrag von $4,5 - 5,0 [\times 10^{11}]$ und für die Tripel-Apherese-Spender ein zu erzielender Ertrag von $8,0 [\times 10^{11}]$ eingegeben.

Mithilfe einer 2,7 ml K-EDTA-Monovette® (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) wurde ein aktuelles Blutbild des Spenders mit dem Hämatologie-Analysator SF-3000 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) gemessen und der Hämatokrit-Wert incl. der Plättchenkonzentration im Spendemenü aktualisiert. Aus diesem Blutprobenbeutel wurden bei allen sechs konsekutiven Spenden weitere 9 ml Blut in eine Serum-Monovette® (Sarstedt AG) für die Bestimmung der TPO-Konzentration vor der Spende entnommen. Nach ca. 10 – 15 min wurden diese Röhrchen für 10 min mit 4000 U/min scharf zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Danach wurde das Serum auf zwei Polypropylenröhrchen (CRYO.S™, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) verteilt und bei - 80 °C gelagert.

Nachdem die Thrombozytapherese beendet war, wurden die beiden Präparatebeutel versiegelt und unter Verwendung des Sterilschweißgerätes vom Schlauchsystem getrennt. Dem Spender wurde, nachdem ca. 9 ml Blut verworfen wurde, aus der noch liegenden Aphereseakanüle erneut eine Blutprobe abgenommen. Für die erneute Bestimmung des Blutbildes nach der Spende wurde Blut in eine 2,7 ml K-EDTA-Monovette® entnommen. Etwas Probenmaterial des gesammelten TKs wurde für die Bestimmung der Plättchenkonzentration in eine 2,7 ml K-EDTA-Monovette® gefüllt. Auch für diese Messungen wurde der Hämatologie-Analysator SF-3000 verwendet. Für die Evaluierung der TPO-Konzentration nach der Spende wurde ein weiteres Röhrchen Blut in eine 9 ml Serum-Monovette® abgenommen. Diese Serum-Monovetten® wurden wiederum nach ca. 10 – 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert, das Serum auf zwei Polypropylenröhrchen verteilt und bei - 80 °C eingefroren.

Nach der Apherese und der Blutrückführung wurde das Schlauchset aus dem Zellseparator entfernt und ordnungsgemäß entsorgt.

Da das in den Zellseparator eingelegte Aphereseset herstellerseitig lediglich mit zwei Präparatebeutel ausgestattet war, musste nach den Tripel-Apherese-Spenden ein dritter Lagerbeutel (CaridianBCT) mit einem Schweißgerät (TSCD®, Terumo GmbH, Eschborn, Deutschland) steril angebracht werden. Nach dem das gesammelte Volumen gleichmäßig auf die drei Sammelbeutel verteilt war, wurden die drei Beutel mithilfe des Sterilschweißgerätes (Mobilea, Fa. Fresenius Kabi) voneinander getrennt. Die Zeit, die man für diesen Vorgang benötigte, wurde dokumentiert.

Zwei der aus der Tripel-Apherese stammenden TKs wurden jeweils für den Vertrieb freigegeben. Das dritte TK wurde für die Durchführung von Präparate-Qualitätskontrollen zurückbehalten. Die Thrombozytenpräparate wurden bis zum Transport in die Blutbank des Universitätsklinikums unter ständiger Agitation bei 22 ± 2 °C gelagert.

Nach der Thrombozytapherese wurden die Studienteilnehmer der Tripel-Apherese nach evtl. aufgetretenen citratspezifischen Nebenwirkungen befragt und entsprechend dokumentiert.

3.3 Thrombozytaphereseprotokoll

3.3.1 Vor- und Nachbereitungszeit

Im Rahmen dieser Studie wurde mithilfe einer Stoppuhr im Vorfeld des Aphereseverfahrens bei 48 Tripel-Apheresen die Zeit gemessen, die die Operatoren benötigten, um das Apherese-set in den Zellseparator einzulegen. Diese Zeit wird im weiteren Teil der Arbeit als Vorbereitungszeit gekennzeichnet. Die Vorbereitungszeit wurde in der Einheit [min] dokumentiert und angebrochene Minuten aufgerundet.

Ebenso wurde im Anschluss an 48 Tripel-Apheresen die Nachbereitungszeit erfasst. Die Nachbereitungszeit begann nach der Diskonnektion des Spenders vom Apherese-set bis zu dem Zeitpunkt, ab dem das gewonnene Konzentrat auf drei Präparatebeutel aufgeteilt war und für den Transport zur Blutbank bereitlag. Die Angabe der Nachbereitungszeit wurde in der Einheit [min] festgehalten, wobei angebrochene Minuten ebenfalls aufgerundet wurden.

Die Vor- und Nachbereitungszeit wurden lediglich bei den Tripel-Apherese-Spenden erhoben.

3.3.2 Spenderdaten

Während der sechs konsekutiven Thrombozytenspenden sind eine Reihe von Spenderdaten erfasst worden.

Folgende Spenderdaten wurden sowohl bei den Tripel-Apherese-Spendern als auch bei den Doppel-Apherese-Spendern einmalig am Beginn der Studie erfasst:

- Geschlecht
- AB0- und Rhesus-Blutgruppe
- Alter in vollständig beendeten Lebensjahren [a]

- Körpergewicht [kg]
- Körpergröße [cm]
- Body-mass-Index (BMI) [kg/m²]:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{(\text{Körpergröße [m]})^2}$$

- Gesamtblutvolumen (GBV) [l], berechnet in Abhängigkeit vom Geschlecht nach der von Nadler et al. publizierten Methode zur Berechnung des Blutvolumens (Nadler SB et al., 1962):

$$GBV \text{ ♂}$$

$$= 0,03219 \times \text{Körpergewicht [kg]} + 0,3669 \times (\text{Körpergröße [m]})^3 + 0,6041$$

$$GBV \text{ ♀}$$

$$= 0,03308 \times \text{Körpergewicht [kg]} + 0,3561 \times (\text{Körpergröße [m]})^3 + 0,1833$$

Folgende Spenderdaten wurden, unabhängig vom jeweiligen Spendeverfahren (Tripel-Apherese, Doppel-Apherese), bei allen sechs Thrombozytenspenden dokumentiert:

- Spendeabstand: Abstand zwischen zwei Spenden [d]
- Blutbild und Thrombopoetinkonzentration vor der Apherese:
 - Plättchen-Vorwert (prä-PLT) [1/nl]
 - Vorwert des mittleren Plättchenvolumens (prä-MPV) [fl]
 - Hämatokrit-Vorwert (prä-Hkt) [%]
 - Leukozyten-Vorwert (prä-WBC) [1/nl]
 - Thrombopoetin-Vorwert (prä-TPO) [pg/ml]
- Blutbild und Thrombopoetinkonzentration nach der Apherese:
 - Plättchen-Nachwert (post-PLT) [1/nl]
 - Nachwert des mittleren Plättchenvolumens (post-MPV) [fl]
 - Hämatokrit-Nachwert (post-Hkt) [%]
 - Leukozyten-Nachwert (post-WBC) [1/nl]
 - Thrombopoetin-Nachwert (post-TPO) [pg/ml]

3.3.3 Verfahrensdaten

Die aufgelisteten Werte wurden aus der angegebenen Verfahrenszusammenfassung des Zell-separators sowohl bei den Tripel-Apheresen als auch bei den Doppel-Apheresen aufgezeichnet:

- verarbeitetes Blutvolumen (VBV) [ml]
- Volumenangabe des gesammelten TKs [ml]
- maschinell gemessene Verfahrenszeit bis zum Separationsende ohne Blutrückführungszeit [min]

Zudem wurde folgender Parameter für die beiden Apheresearten gemessen:

- gemessene PLT-Konzentration des TKs [1/nl]

Für die Studienteilnehmer der Tripel-Apherese wurden bei allen sechs Spenden zusätzlich die nachfolgenden Parameter dokumentiert bzw. bestimmt:

- kalkulierte Verfahrenszeit [min] des Trima Accel-Systems nach Eingabe der aktuellen Vorwerte des Spenders
- ACD-Gesamtverbrauch [ml] (aus der Verfahrenszusammenfassung)
- AK an Spender [ml] (aus der Verfahrenszusammenfassung)
- ACD-Infusionsrate („citrate infusion rate“, CIR) [ml/min/l]:

$$CIR = \frac{AK \text{ an Spender } [ml]}{\left(\frac{Verfahrenszeit [min]}{Gesamtblutvolumen [l]} \right)}$$

- Berechnung des TK-Volumens [ml] aus dem gemessenen TK-Gewicht [g] durch eine geeichte Waage (PB 5001, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland), der Dichte [g/ml] des TKs und dem Leergewicht des Beutel- und Schlauchsystems [g]:

$$TK - Volumen = \frac{TK - Gewicht [g] - Leergewicht_{Beutel- \& Schlauchsystem} [g]}{Dichte \text{ des Konzentrats } \left[\frac{g}{ml} \right]}$$

Für die Berechnung des TK-Volumens wurden die in der Tabelle 2 aufgelisteten mittleren Dichten für Blutplasma ($\delta = 1,026 \text{ g/ml}$) und der Blutplättchen ($\delta = 1,058 \text{ g/ml}$) zugrunde gelegt.

Das Gewicht des Beutel- und Schlauchsystems berechnete sich aus den folgenden Einzelgewichten:

Präparatebeutel	= 33 g
Klemme	= 1,4 g
Verbindungsstück	= 0,8 g
Plastikschlauch pro cm	= 0,1 g

- gemessener PLT-Ertrag [$\times 10^{11}$]: aus der gemessenen PLT-Konzentration [1/nl] und dem gemessenen TK-Volumen [ml] berechnete PLT-Gesamtzahl
- Erfassung der in Tabelle 5 nach Bueno et al. aufgelisteten citratspezifischen Nebenwirkungen (Bueno JL et al., 2005). Diese kommen durch die Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit des Citrats mit dem daraus resultierenden Abfall des Serumcalciumspiegels zustande.

**Tabelle 5: Citratspezifische Nebenwirkungen
(McLeod-Kriterien nach Bueno JL et al., 2005)**

Grad	Spendereffekt
0	keine Auswirkungen im Zusammenhang mit Citrat
1	Parästhesien, metallischer Geschmack, Schüttelfrost oder Kältegefühl
2	die gleichen Symptome wie bei Grad 1 trotz Gabe von Calcium
3	Zittern, Schüttelfrost oder Übelkeit oder persistierende geringfügige Symptome nach Reduzierung der Citratinfusionsrate
4	zusätzliche Calciumtablette benötigt, um die Symptome zu reduzieren oder Erbrechen und Krämpfe oder Aufforderung des Spenders das Verfahren zu beenden (ausgenommen sind Ursachen, die nicht auf die Hypokalzämie zurückzuführen sind)
5	Verlust des Bewusstseins oder Krampfanfälle oder Herzrhythmusstörungen oder mehr schwerwiegende Symptome (ausgenommen sind Ursachen, die nicht auf die Hypokalzämie zurückzuführen sind)

Um im späteren Teil dieser Arbeit die Ergebnisse mit anderen Studien vergleichen zu können, wurden aus den Spender- und Verfahrensdaten der Tripel-Apheresen die folgenden Angaben berechnet:

- Berechnung der Sammlungsrate („collection rate“, CR) [$\times 10^{11}$ /h]:

$$CR = \frac{\text{gemessener PLT} - \text{Ertrag} [\times 10^{11}] \times 60}{\text{maschinell gemessene Verfahrenszeit} [\text{min}]}$$

- Berechnung der Sammlungseffizienz („collection efficiency“, CE) [%]:

$$CE = \frac{\text{gemessener PLT} - \text{Ertrag} [\times 10^{11}] \times 100}{\text{VBV} [\text{l}] \times \left(\frac{\text{prä-PLT} + \text{post-PLT}}{2} \right)}$$

- Berechnung der Zeit für die Standarddosis zum Sammeln von $8,0 \times 10^{11}$ Thrombozyten („time for standard dose“, TSD 8,0) [min]:

$$TSD = \frac{\text{maschinell gemessene Verfahrenszeit} [\text{min}] \times 8,0 [\times 10^{11}]}{\text{gemessener PLT} - \text{Ertrag} [\times 10^{11}]}$$

Aus der Datenerhebung für die Studienteilnehmer der Tripel-Apherese konnten folgende Angaben zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel berechnet werden:

- Gerätegenauigkeit Verfahrenszeit [min]:

$$\text{maschinell gemessene Verfahrenszeit} [\text{min}] - \text{Geräteangabe kalkulierte Verfahrenszeit} [\text{min}]$$

- Gerätegenauigkeit TK-Volumen [ml]:

$$\text{gemessenes TK-Volumen} [\text{ml}] - \text{Geräteangabe gesammeltes TK-Volumen} [\text{ml}]$$

- Gerätegenauigkeit PLT-Ertrag [$\times 10^{11}$]:

$$\text{gemessener PLT-Ertrag} [\times 10^{11}] - 8,0 [\times 10^{11}]$$

- Gerätegenauigkeit PLT-Konzentration [1/nl]:

$$\text{gemessene PLT-Konzentration [1/nl]} - 1212 \text{ [1/nl]}$$

In der folgenden Tabelle 6 sind nochmals die in dem Thrombozytaphereseprotokoll erfassten Untersuchungsparameter, getrennt nach der erfolgten Apheresespende (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese) als Übersicht dargestellt.

Tabelle 6: Thrombozytaphereseprotokoll getrennt nach der Apheresespende (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)

Vor- und Nachbereitungszeit	Tripel-Apherese	Doppel-Apherese
Vorbereitungszeit	✓	Ø
Nachbereitungszeit	✓	Ø
Spenderdaten		
Geschlecht	✓	✓
AB0- und Rhesus-Blutgruppe	✓	✓
Alter	✓	✓
Körpergewicht	✓	✓
Körpergröße	✓	✓
Body-mass-Index	✓	✓
Gesamtblutvolumen	✓	✓
Spendeabstand	✓	✓
prä-PLT, prä-MPV, prä-Hkt, prä-WBC, prä-TPO	✓	✓
post-PLT, post-MPV, post-Hkt, post-WBC, post-TPO	✓	✓
Verfahrensdaten		
Geräteangabe verarbeitetes Blutvolumen	✓	✓
Geräteangabe Volumen des TKs	✓	✓
Geräteangabe Verfahrenszeit	✓	✓
gemessene PLT-Konzentration des TKs	✓	✓
Geräteangabe kalkulierte Verfahrenszeit	✓	Ø
Geräteangabe ACD-Gesamtverbrauch	✓	Ø
Geräteangabe AK an Spender	✓	Ø
berechnete ACD-Infusionsrate	✓	Ø
gemessenes TK-Volumen	✓	Ø
gemessener PLT-Ertrag	✓	Ø
citratspezifische Nebenwirkungen	✓	Ø
Sammlungsrate	✓	Ø
Sammlungseffizienz	✓	Ø
Zeit für die Standarddosis	✓	Ø
Gerätegenauigkeit Verfahrenszeit	✓	Ø
Gerätegenauigkeit TK-Volumen	✓	Ø
Gerätegenauigkeit PLT-Ertrag	✓	Ø
Gerätegenauigkeit PLT-Konzentration	✓	Ø

3.4 Ablauf des Thrombopoetin-ELISAs

Ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein sensitives Verfahren, das mithilfe von Antikörpern eine Vielzahl von Substanzen nachweisen kann. Durch ein ELISA lassen sich die nachzuweisenden Antigene auch quantitativ bestimmen.

Das in der Studie verwendete Verfahren zum Nachweis von humanem Thrombopoetin unter Verwendung des ELISA-Kits Quantikine® (Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) beruht auf einem Sandwich-ELISA.

Die im Rahmen der Thrombozytapheresen gewonnenen Serumproben wurden bei - 80 °C tiefgefroren. Nach der Durchführung aller Apheresen wurden die Serumproben aufgetaut und parallel gemessen.

Die folgenden Materialien und Reagenzien waren im Lieferumfang enthalten und wurden für die Messung der TPO-Konzentration benötigt:

- Mikrotiterplatte: 96 „wells“, die mit einem monoklonalen Mausantikörper gg. TPO beschichtet sind
- TPO-Konjugat: polyklonale Antikörper gg. TPO, die mit HRP gekoppelt sind
- TPO-Standard: enthält rekombinant hergestelltes humanes TPO
- Assay-Diluent RD1-1: proteinhaltiger Puffer
- Calibrator Diluent RD6-11-Konzentrat: proteinhaltiger Puffer
- Waschpuffer-Konzentrat: 25-fach konzentrierte gepufferte Lösung
- Farbreagenz-A: stabilisiertes Hydrogen-Peroxid
- Farbreagenz-B: stabilisiertes Chromogen (TMB)
- Stopplösung: bestehend aus Schwefelsäure
- Klebestreifen: für das Abdecken der Mikrotiterplatte

Vor Beginn mussten die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Die eingefrorenen Serumproben wurden in einem Wasserbad (Liquitherm FV, Clinicon International GmbH, Mannheim, Deutschland) aufgetaut und vorsichtig mit einem Vortex-Mischer (REAX 1 D R, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland) gemischt.

In einem ersten Schritt musste der TPO-Standard hergestellt werden. Dazu wurde in das TPO-Standard-Fläschchen 1000 µl destilliertes Wasser pipettiert und für 15 min unter leichtem Schütteln gemischt. Die auf diese Weise hergestellte Lösung hatte eine TPO-Konzentration von 20.000 pg/ml. Für die Herstellung einer Standardreihe, wurden 8 Eppendorfgefäße (Eppen-

dorf AG) verwendet. In das erste Eppendorfgefäß wurden 900 µl Calibrator-Diluent RD6-11-Konzentrat pipettiert. In die Eppendorfgefäße 2 – 7 wurden lediglich 500 µl Calibrator-Diluent RD6-11-Konzentrat überführt. Aus dem hergestellten Standard mit einer TPO-Konzentration von 20.000 pg/ml wurden 100 µl in das erste Eppendorfgefäß pipettiert und gut durchmischt. Aus dem zuvor hergestellten höchsten Standard (2000 pg/ml) wurden 500 µl in das zweite Eppendorfgefäß überführt. Die in diesem Eppendorfgefäß enthaltene Konzentration an TPO betrug 1000 pg/ml. Nach Durchmischen des Eppendorfgefäßes, wurden aus diesem wiederum 500 µl in das nächste Eppendorfgefäß pipettiert. Durch Wiederholung dieses Prozedere wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit folgenden TPO-Konzentrationen hergestellt: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 126 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml. Das achte Eppendorfgefäß enthielt lediglich 500 µl des Calibrator-Diluent RD6-11-Konzentrats und wurde als Null-Standard verwendet (0 pg/ml). Die nachfolgende Abb. 6 zeigt den beschriebenen Ablauf zur Herstellung der Verdünnungsreihe.

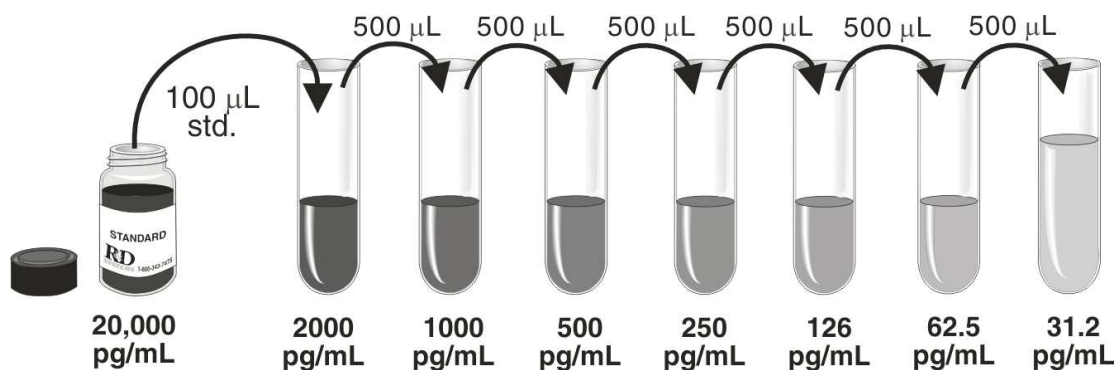


Abb. 6: Herstellung der Verdünnungsreihe zum Nachweis von humanem TPO (Produktinformation Quantikine® Human TPO Immunoassay, Fa. R&D Systems, 2009)

Nachdem die Verdünnungsreihe vorbereitet war, wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 50 µl Assay-Diluent RD1-1 pipettiert.

Danach wurden in jede Vertiefung 200 µl der Standard- oder Serumproben übertragen. Wie in der Produktinformation empfohlen, wurde sowohl für die Standard- als auch für die Serumproben eine Doppelbestimmung durchgeführt, sodass jede Probe jeweils auf zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte aufgebracht worden ist. Nachdem die Mikrotiterplatte mit den Standard- und Serumproben bestückt war, wurde die Platte mit einem Klebestreifen abgedeckt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde das Waschpufferkonzentrat (20 ml) durch Zugabe von 480 ml destilliertem Wasser verdünnt.

Nach diesen 3 h wurde die Mikrotiterplatte abgeschüttet und insgesamt viermal mit der verdünnten Waschpufferlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Platte gründlich auf Papier ausgeklopft, sodass möglichst kein Waschpuffer mehr zurückbleiben konnte.

Nachfolgend wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl TPO-Konjugat befüllt. Anschließend wurde die Platte erneut abgedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde die Substratlösung vorbereitet. Dazu wurden die beiden Farbreagenzien-A und -B im Verhältnis 1:1 gemischt und die Substratlösung in ein lichtundurchlässiges Kunststoffröhrchen gefüllt.

Die Mikrotiterplatte wurde nach dieser 1 h Inkubationszeit abgeschüttet und wiederum viermal mit der verdünnten Waschpufferlösung nach dem gleichen Prinzip wie zuvor gereinigt. Danach wurden in die Vertiefungen jeweils 200 µl der Substratlösung pipettiert. Das in der Substratlösung enthaltene TMB (Tetramethylbenzidin) wurde dann von dem Enzym HRP („horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase), das an die Antikörper im TPO-Konjugat gekoppelt war, umgesetzt. Die Farbintensität entwickelte sich dabei proportional zu der gebundenen Menge an TPO. Dafür wurde die Mikrotiterplatte ein drittes Mal bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde in jede Vertiefung 50 µl der Stopplösung gegeben. Die Stopplösung sorgte für einen Farbwechsel von blau nach gelb und beendete die enzymatische Umwandlung der Substratlösung. Anschließend wurden die Absorptionen mit dem Photometer FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland) bei 450 nm gemessen und anhand der Standardkurve die TPO-Serumkonzentrationen quantifiziert. Zur Optimierung der Ergebnisse wurde, wie vom Hersteller des verwendeten ELISA-Kits empfohlen, mit einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Da von jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt worden ist, wurde das Ergebnis der TPO-Konzentration einer Probe, als Mittelwert der beiden Einzelmessungen von der Computersoftware berechnet.

Angaben zur Sensitivität des Testverfahrens werden vom Hersteller R&D Systems wie folgt angegeben: die kleinste messbare Dosis („minimal detectable dose“, MDD) schwankt zwischen 2,78 – 18,5 pg/ml mit einem Mittelwert von 7,45 pg/ml. Abb. 7 zeigt die mithilfe des Photometers FLUOstar OPTIMA berechnete Standardkurve, aus der die mittleren Konzentrationen an TPO in den Proben berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Absorption an, auf der Abszisse sind die entsprechenden TPO-Konzentrationen aufgeführt.

FLUOstar OPTIMA Testname: TROMBOPOETIN 2009.12.15 17:03:24 ☐ Hide parameter settings
 BMG Labtechnologies ID 1,2,3: 2114.dbf ☐ Hide standard curve

Absorbance, plate mode equidistant
 Evaluation type Average
 Calculation Start1 1 Stop1 1 Start2 0 Stop2 0
 Selected Range1, Channel 1
 Table calculation None
 Curve fitting 4 Parameter Fit

a 1,62E-1
 b 1,16E0
 c 4,16E3
 d 9,072E0
 R 0,999925

Comment

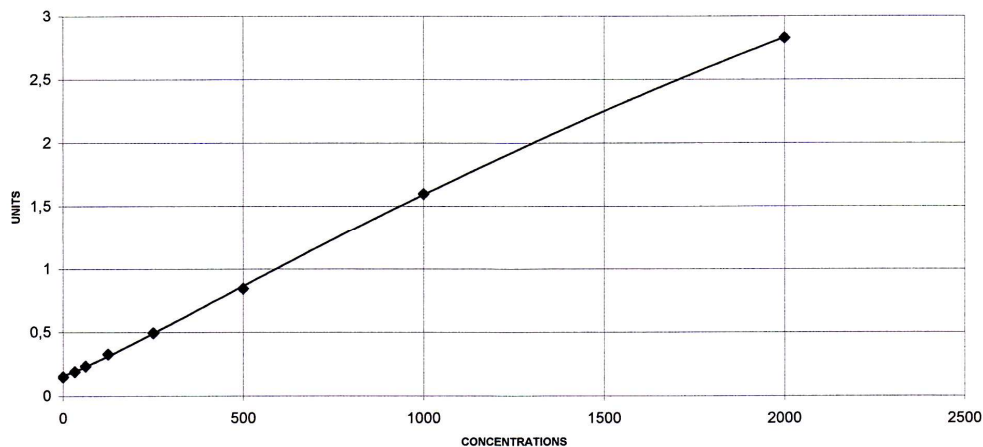


Abb. 7: Standardkurve zur quantitativen Messung von TPO mit dem Photometer FLUOstar OPTIMA

3.5 Evaluierung des Spenderkomforts

Nachdem die sechs konsekutiven Apheresen durchlaufen waren, wurden die Spender in einem standardisierten Interview gebeten, Fragen zum Komfort während des Spendeverfahrens zu beantworten. An dem standardisierten Interview nahmen nur die Studienteilnehmer der Tripel-Apherese teil.

Die folgenden drei Fragen konnten mit 1 = ausgezeichnet, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = ungenügend und 5 = schlecht bewertet werden:

- Wie bewerten Sie ihr allgemeines Wohlbefinden während der letzten sechs Spenden?
- Wie empfanden Sie den Entnahmefluss?
- Wie empfanden Sie den Rückfluss?

Außerdem wurden die Teilnehmer gebeten, die folgenden vier Kriterien zu bewerten. Die Kriterien konnten dabei mit 1 = sehr wichtig, 2 = wichtig, 3 = neutral und 4 = unwichtig beurteilt werden:

- Kurze Dauer des Spendeverfahrens
- Verträglichkeit des Verfahrens
- Angenehme Flussgeschwindigkeit
- Spende mit nur einer Nadel

3.6 Evaluierung des Operatorenkomforts

Im Anschluss an die Studie wurden die beteiligten Operatoren des Blutspendedienstes gebeten, einen Fragebogen bezüglich der Zufriedenheit im Umgang mit dem Trima Accel-Sammlsystem zu beantworten.

In diesem Fragebogen waren insgesamt fünf Kriterien wie folgt zu bewerten: 1 = ausgezeichnet, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = ungenügend und 5 = schlecht.

- Aufrüsten des Gerätes
- Abrüsten des Gerätes
- Durchführung des Sammelverfahrens
- Bearbeitung von Fehlermeldungen
- Menüführung

3.7 Qualitätskontrolle

3.7.1 Allgemeines

Die Thrombozytenpräparate für die Qualitätskontrollen wurden über sieben Tage unter ständiger Agitation (Köttermann-Agitator 4010, Köttermann GmbH, Uetze/Hänigsen, Deutschland) bei 22 ± 2 °C gelagert. Kontrolluntersuchungen an dem TK fanden dabei am Herstellungstag (Tag 1), am fünften Tag der Lagerung (Tag 5) sowie am siebten Tag der Lagerung (Tag 7) statt. Dabei wurden an allen drei Untersuchungstagen ca. 10 – 15 ml des TKs für die Evaluierung entnommen. Die für die Entnahme des Konzentrats vorgesehenen Plastikschräuche, die sich an dem Präparatebeutel befinden, wurden am Tag der Herstellung relativ

kurz nach ca. 10 – 15 cm steril abgeschweißt. Bei der Probenentnahme am fünften und siebten Tag wurden die ersten 2 – 3 ml des Konzentrats nach Stripping des Schlauchsystems und Mischen des Präparatebeutels verworfen, um evtl. aggregierte Plättchen zu eliminieren, die sich in dem Schlauchsystem befanden. Die entnommene Probe wurde für die weiteren Untersuchungen in ein Röhrchen aus Polypropylen gefüllt und das TK erneut mit dem Sterilschweißgerät verschlossen.

Die nachfolgende Tabelle 7 gibt einen Überblick über die analysierten Parameter und die dabei verwendeten Methoden incl. Angaben zum Hersteller des verwendeten Produkts. Weiterhin erkennt man, an welchen Tagen die Qualitätskontrollen durchgeführt worden sind.

**Tabelle 7: Überblick Qualitätskontrollen:
Parameter, Methode, Gerät/ Hersteller und Tag der Qualitätskontrollen**

Parameter	Methode	Gerät/ Hersteller	Tag der Qualitätskontrollen		
			Tag 1	Tag 5	Tag 7
Konzentratvolumen vor und nach der Probenentnahme	Gewichtsmessung mit geeichter Waage	PB 5001; Mettler-Toledo GmbH	✓	✓	✓
Swirling-Phänomen (Wolkenbildung des TKs)	visuelle Beurteilung	∅	✓	✓	✓
Glukose, Laktat, LDH	Hexokinase, Laktatoxidase, Laktatdehydrogenase flüssig nach IFCC	Modular P; Roche Diagnostics GmbH	✓	✓	✓
Thrombozytenkonzentration, MPV	Hämatologie-Analysator	SF-3000; Sysmex Europe GmbH	✓	✓	✓
pH-Messung	pH-Meter	MeterLab® PHM 220; Radiometer Analytical SAS	✓	✓	✓
Resterythrozyten	Neubauerkammer	∅	✓	∅	∅
Thrombozytenaggregation (ADP- und Kollagen-induziert)	Aggregometer	LABOR-APACT-Aggregometer; Rolf Greiner BioChemica GmbH	✓	✓	✓
Restleukozyten	Durchflusszytometrie	BD FACScan™; BD Biosciences	✓	∅	∅
CD62P	Durchflusszytometrie	BD FACScan™; BD Biosciences	✓	✓	✓
Sterilität	aerobe und anaerobe Bakterienkulturen	BD BACTEC™ Plus Aerobic/F+ Anaerobic/F; BD Biosciences	∅	∅	✓
Citrat	Citronensäure UV-Test	Enzytec™ Citronensäure; R-Biopharm AG	✓	✓	✓

3.7.2 Konzentratvolumen

Die Berechnung des Konzentratvolumens erfolgte sowohl vor als auch nach der Probenentnahme und wurde an allen drei Qualitätskontrolltagen bestimmt. Analog zu Kapitel 3.3.3 konnte das Konzentratvolumen aus folgenden Angaben berechnet werden: TK-Gewicht, mittlere Dichte des Plasmas und der Blutplättchen, Leergewicht des Beutel- und Schlauchsystems.

3.7.3 Swirling und Aggregatbildung

Durch visuelle Kontrolle wurde an allen drei Tagen überprüft, ob das zu untersuchende Thrombozytenkonzentrat eine typische wolkige Opaleszenz („swirling effect“) oder Aggregatbildungen aufwies. Diese visuelle Kontrolle erfolgte durch leichtes Schütteln des Präparatebeutels gegen eine Lichtquelle und das Ergebnis wurde dokumentiert (siehe Abb. 8).

Der „swirling effect“ ist auf die Lichtstreuung beim Auftreffen von Lichtstrahlen auf normale diskoidale Blutplättchen zurückzuführen. Die Wolkenbildung nimmt ab oder verschwindet, wenn die Blutplättchen während der Lagerung aktiviert werden, da die Plättchen dann vermehrt in einer spheroide Form vorliegen und die Lichtstreuung geringer ausfällt (Kaufman RM, 2006; Hervig T et al., 1999).

Das Ausmaß des Swirling-Phänomens wurde in der Studie in vier Untergruppen (Grad 0 – Grad 3) unterteilt und ist in Tabelle 8 zusammengefasst (Dijkstra-Tiekstra MJ et al., 2004).

Tabelle 8: Einteilung des Swirling-Phänomens (Dijkstra-Tiekstra MJ et al., 2004)

Grad	Swirling-Phänomen
3	wolkige Inhomogenität, Kontrast als feine Details im Präparatebeutel sichtbar
2	wolkige Inhomogenität mit gutem Kontrast überall in dem Präparatebeutel
1	einige Inhomogenitäten sind sichtbar, aber nur an manchen Stellen mit schlechtem Kontrast
0	kein Swirling-Phänomen, trübe Homogenität



Abb. 8: Überprüfung des Swirling-Phänomens

3.7.4 Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase

Sowohl am Herstellungstag als auch am fünften und siebten Tag der Lagerung wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums die Konzentrationen von Glukose, Laktat und LDH bestimmt. Dazu wurden 2 ml der aus dem TK entnommenen Probe auf zwei Probenröhrchen aus Polypropylen (CRYO.S™, Greiner Bio-One GmbH) verteilt und diese an das Zentrallabor gesendet. Zur Glukosebestimmung wurde die Hexokinasereaktion verwendet. Die Laktatoxidasereaktion wurde für die Evaluierung der Laktatkonzentration eingesetzt. Um die LDH-Konzentration im dem TK zu bestimmen wurde Laktatdehydrogenase flüssig nach der IFCC-Methode angewandt. Die entsprechenden Konzentrationen wurden mit dem Modular P (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) quantifiziert.

3.7.5 Thrombozytenkonzentration und mittleres Plättchenvolumen

Die Thrombozytenkonzentration des Präparates und das mittlere Plättchenvolumen wurden mit dem Hämatologie-Analysator SF-3000 gemessen und die Ergebnisse dokumentiert. Kurz vor der Messung wurde das Probenröhrchen sachte gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Blutplättchen im Konzentrat zu gewährleisten.

3.7.6 pH-Wert

Die Messung des pH-Wertes wurde direkt nach der Probenentnahme durchgeführt. Eine Kalibrierung des pH-Meters (MeterLab® PHM 220, Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne, Frankreich) musste spätestens alle 72 h erfolgen. Für diese Kalibrierung wurden die drei Reagenzien IUPAC Standardpufferlösung pH 4,005, pH 10,012 und pH 7,000 (Radiometer Analytical SAS) verwendet. Eine Kontrollmessung mit der IUPAC-Standardpufferlösung pH 7,000 wurde vor jeder Messung verlangt. Zudem musste vor jeder Messung die mithilfe eines Thermometers gemessene Raumtemperatur in das pH-Meter eingegeben werden.

Bei der Messung wurde eine mit Kaliumchloridlösung befüllte Messelektrode in die Probe eingetaucht. Die Wasserstoffionen haben die Tendenz sich an die Glasoberfläche anzulagern, umso eine galvanische Spannung im Kugelinneren aufzubauen. Das pH-Meter erfasst die dabei auftretende Spannungsdifferenz zwischen der Messelektrode und dem Standard. Um Verfälschungen der Messergebnisse zu verhindern, musste die Glaselektrode nach jeder Messung mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem fussselfreien Tuch trocken gerieben werden.

3.7.7 Resterythrozyten

Lediglich am Herstellungstag wurde die Anzahl der im Thrombozytenpräparat verbliebenen Erythrozyten bestimmt. Dazu wurden die Resterythrozyten mithilfe einer Neubauerkammer an einem Mikroskop ausgezählt.

Mithilfe einer Eppendorfpipette (Eppendorf AG) wurde das Probenmaterial 1:10 mit Hayem'scher Lösung (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH, Leipzig, Deutschland) verdünnt. Dazu wurden 50 µl Probenmaterial mit 450 µl Hayem'scher Lösung vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Hayem'sche Lösung wurden die bei der Erythrozytenzählung störenden Restleukozyten des TKs zerstört. Nachdem die Kammer leicht angefeuchtet worden war, wurde die Neubauerkammer mit einem Deckglas bestückt und dieses leicht angedrückt. Mit der Eppendorfpipette wurde die Neubauerkammer durch Zugabe einiger Mikroliter, der mit Hayem'scher Lösung verdünnten Probe, vom Rand aus befüllt. Die befüllte Neubauerkammer wurde in ein Kunststoffgefäß gelegt, das zum Schutz vor einer möglichen Austrocknung ein feuchtes Papiertuch enthielt, und nach ca. 10 min bei 400-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Laborlux K (Ernst Leitz Wetzlar GmbH) ausgezählt.

Insgesamt wurden für die Auszählung vier Gruppenquadranten, mit einer Gesamtfläche von 4 mm^2 , verwendet. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ($10\times$) und der Kammer-tiefe ($0,1 \text{ mm}$) ergibt sich eine Erythrozytenzahl ($N_{\text{Erythrozyten}}$) pro μl , die man durch Multipli-kation aus der Anzahl der ausgezählten Erythrozyten in der Neubauerkammer mit dem Faktor 25 erhält. Für die Berechnung der Gesamtzahl der Erythrozyten im Präparat, wurde das Er-gebnis mit dem Gesamtvolumen des Thrombozytenkonzentrats multipliziert.

$$N_{\text{Erythrozyten}} = \frac{\text{Anzahl ausgezählter Erythrozyten} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Gesamtfläche der vier Gruppenquadranten } [\text{mm}^2] \times \text{Kammertiefe } [\text{mm}]}$$

$$N_{\text{Erythrozyten}} = \text{Anzahl ausgezählter Erythrozyten} \times \frac{10}{4 \times 0,1} \left[\frac{1}{\mu\text{l}} \right]$$

$$N_{\text{Erythrozyten}} = \text{Anzahl ausgezählter Erythrozyten} \times 25 \left[\frac{1}{\mu\text{l}} \right]$$

3.7.8 ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation

Die turbidimetrische Aggregation ist die am häufigsten eingesetzte Methode zur Messung der Thrombozytenaggregation. Sie wurde erstmals 1962 von Born beschrieben, weshalb man auch von der Thrombozytenaggregationsmessung nach Born spricht (Born GV, 1962).

Das verwendete Verfahren beruht auf einer Veränderung der Lichttransmission durch plättchenreiches Plasma nach Zugabe eines Agonisten (siehe Abb. 9). Die Änderung der Lichttransmission wird durch einen Aggregometer erfasst und mit der durch plättchenarmes Plasma verglichen (McGlasson DL et al., 2009).

Die Messung der ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation erfolgte an allen drei Tagen der Qualitätskontrollen.

Das verwendete Labor-APACT-Aggregometer (Rolf Greiner BioChemica GmbH, Flacht, Deutschland) wurde zum Vorheizen ca. 15 – 20 min vor der eigentlichen Messung angeschaltet. Mit einer wassergefüllten Küvette (LABiTec GmbH, Ahrensburg, Deutschland) wurde vor der Messung die Temperatur im Thermoblock bestimmt. Diese lag annähernd bei 37°C .

Für die Herstellung von PPP wurden ca. 2 ml der aus dem TK entnommenen Probe bei 4000 U/min für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf AG).

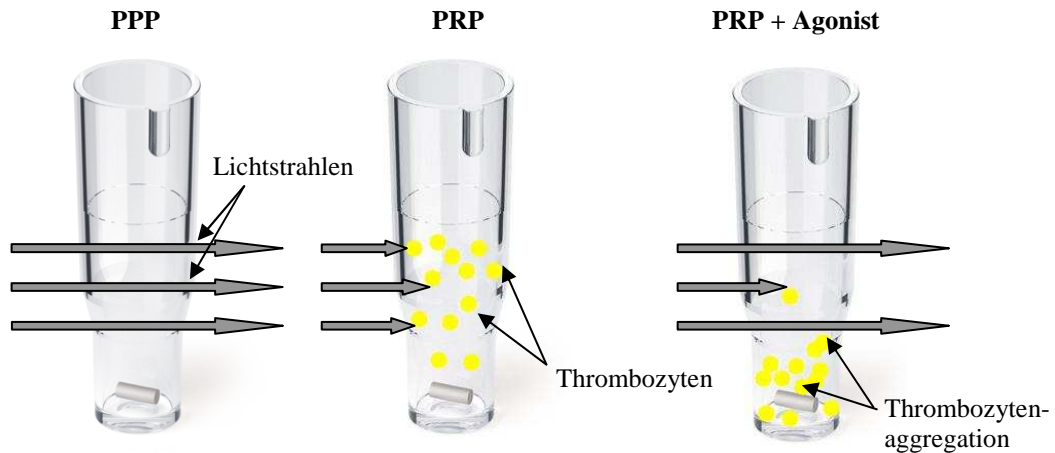


Abb. 9: Lichttransmission durch plättchenarmes Plasma und plättchenreiches Plasma vor und nach Zugabe eines Agonisten

Danach wurde das PRP der zu untersuchenden Probe, mithilfe des PPP, auf eine Konzentration von 300/nl eingestellt. Für die Herstellung des PRPs wurden 300 µl der zu untersuchenden Probe mit einem bestimmten Volumen des PPPs vermischt.

Das für die Verdünnung benötigte Volumen des plättchenarmen Plasmas (V_{PPPP}) ergab sich aus folgender Berechnung:

$$V_{\text{PPPP}} [\mu\text{l}] = \text{gemessene Thrombozytenkonzentration} \left[\frac{1}{\text{nl}} \right] - 300$$

Da die Thrombozytenaggregation mit ADP und Kollagen induziert wurde, mussten zwei Küvetten mit 450 µl PRP befüllt werden.

Vor der Messung wurden die Agonisten vorbereitet. Das ADP (Rolf Greiner BioChemica GmbH) musste durch Zugabe von 1000 µl destilliertem Wasser in Lösung gebracht werden. Die hergestellte ADP-Lösung hatte eine Konzentration von 200 µmol/l. Das Kollagenreagenz Horm® Suspension (Nycomed Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) musste verdünnt werden. Dazu wurden 100 µl Kollagenreagenz mit 150 µl SKF-Lösung (Nycomed Pharma GmbH) gemischt.

Bevor mit der Messung begonnen werden konnte musste das Gerät durch das PPP auf 100 % und durch das PRP auf 0 % in beiden Kanälen eingestellt werden. Im Vorfeld wurde die Messdauerbegrenzung bei 5 min festgelegt.

Da es sich bei dem verwendeten Gerät um ein Zweikanalaggregometer handelte, konnten die beiden Messungen parallel durchgeführt werden.

Durch die Zugabe von 50 µl ADP-Lösung in 450 µl PRP wurde die Messung im ersten Kanal gestartet. Die Endkonzentration des verwendeten ADPs betrug 20 µmol/l. Direkt danach wurde in die zweite Küvette mit 450 µl PRP 50 µl der verdünnten Kollagenlösung pipettiert und die Messung begonnen. Das in der Küvette befindliche Kollagen hatte dabei eine Endkonzentration von 40 µg/ml.

Der Küvetteninhalt wurde mithilfe eines Magneten bei 1000 U/min im Strahlengang des Photometers gerührt. Die Zunahme der Lichttransmission, die durch das Eintreten der Thrombozytenaggregation und das Absinken der Aggregate auf den Küvettenboden zustande kommt, wurde photooptisch bei 740 nm registriert und als Kurve dargestellt. Der Papiervorschub des APACT-Printer-Plotters (Rolf Greiner BioChemica GmbH) betrug 3 cm pro Minute. Nachdem die beiden Messungen beendet waren, konnten die maximalen Aggregationen mithilfe der maximalen Amplituden dokumentiert werden. Die maximale Aggregation wird in % der theoretisch möglichen Aggregation (100 %) angegeben. Eine 100 % Aggregation entspricht einer Lichttransmission wie durch PPP.

In Abb. 10 wurden zwei Thrombozytenaggregationsmessungen mit dem Labor-APACT-Aggregometer wie oben beschrieben durchgeführt. Anhand der Amplituden lassen sich die maximalen Aggregationen für ADP und Kollagen ablesen.

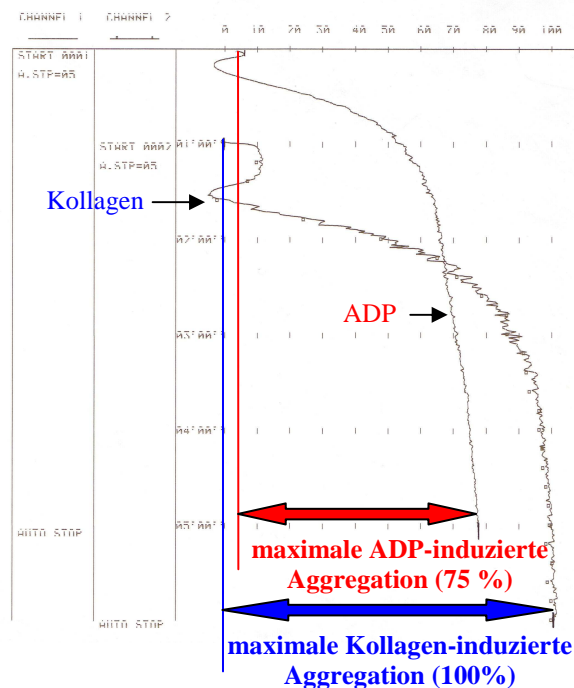


Abb. 10: ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation (Labor-APACT-Aggregometer)

3.7.9 Thrombozytenaktivierung mittels CD62P

Mithilfe der Durchflusszytometrie können innerhalb kurzer Zeit tausende Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße und ihrer Zellgranularität untersucht werden. Durch die Bindung von fluoreszenzmarkierten Molekülen können einzelne Zelltypen analysiert und sicher voneinander abgegrenzt werden. Mittels fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern können spezielle Strukturen auf Zelloberflächen markiert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit gezielt aktivierungsabhängige Antigene auf Blutplättchen, wie das CD62P-Antigen, zu markieren und die Plättchen des TKs auf ihren Aktivierungszustand hin zu untersuchen.

Die Messung der Thrombozytenaktivierung durch den Durchflusszytometer BD FACScan™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) erfolgte an allen drei Tagen der Qualitätskontrollen. Für die Messung wurde das Softwareprogramm BD FACSCComp™ (BD Biosciences) verwendet.

Zur Überprüfung der Instrumenteneinstellung wurde einmal wöchentlich eine Kontrollmessung mit den BD CaliBRITE™-Beads (BD Biosciences) durchgeführt. Dazu wurde in ein erstes BD Falcon™-Röhrchen (BD Biosciences) 1 ml BD FACSFlow™ (BD Biosciences) und 1 Tropfen BD CaliBRITE™ unlabeled beads gegeben. Dieses wurde für die Photomultipliereinstellung verwendet. In ein zweites Röhrchen wurden 3 ml BD FACSFlow™ pipettiert und anschließend je ein Tropfen BD CaliBRITE™ unlabeled beads, PE beads und FITC beads hinzugefügt und konnte für die Fluoreszenzkomensation und einen Empfindlichkeitstest benutzt werden.

Zuerst musste die aus dem TK entnommene Probe fixiert werden. Dazu wurden 100 µl Probenmaterial mit 250 µl EDTA-Formaldehyd-Phosphatpufferlösung (Monovetten®-System zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation nach Grottemeyer, Rheomed GmbH, Hiddenhausen, Deutschland) versetzt. Der Formaldehydanteil in der F-Monovette® wird mit < 1,1 % angegeben. Die Berechnung der benötigten Probenvolumina wurde wie folgt vorgenommen:

(A) Probenvolumina für den Leerwert (1) und den CD42b-PE-Ansatz (3) [µl]:

$$V = \left[\frac{5000}{\frac{\text{gemessene Thrombozytenkonzentration} \left[\frac{l}{nl} \right]}{3,5}} \right]$$

- (B) Probenvolumina für den CD42a-FITC-Ansatz (2) und den CD42a-FITC/CD62-PE-Ansatz (4) [μ l]:

$$V = \left[\frac{1000}{\frac{\text{gemessene Thrombozytenkonzentration} \left[\frac{l}{nl} \right]}{3,5}} \right]$$

Für die Messung wurden vier BD Falcon™-Röhrchen vorbereitet und mit 1 – 4 beschriftet:

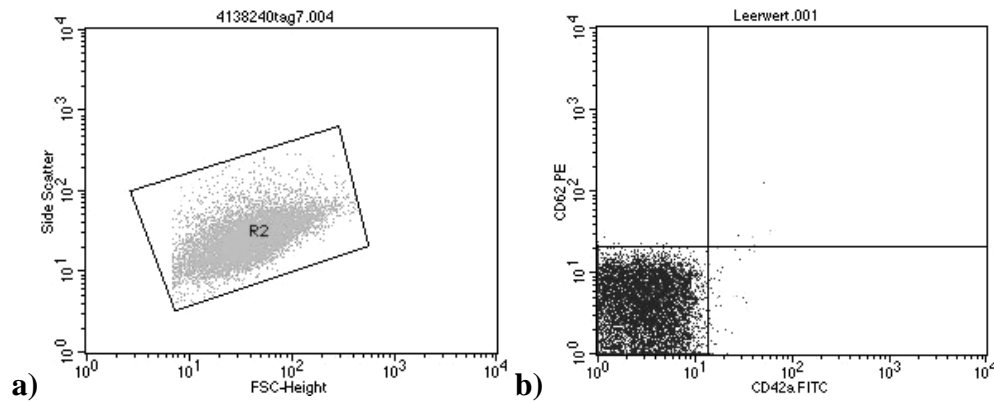
- (1) In das erste Röhrchen wurde, für die Messung des Leerwertes, lediglich das entsprechende Volumen der fixierten Probelösung pipettiert.
- (2) Zu 20 μ l CD42a-FITC-Antikörpern (BD Biosciences) wurde das entsprechende Volumen der fixierten Lösung gegeben.
- (3) Nachdem 20 μ l CD42b-PE-Antikörper (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) in das Röhrchen pipettiert worden sind, wurde das entsprechende Probenvolumen hinzugefügt.
- (4) In das letzte Röhrchen wurden 20 μ l CD42a-FITC-Antikörper, 20 μ l CD62-PE-Antikörper (BD Biosciences) und das berechnete Probenvolumen zusammengeführt.

Die vier Röhrchen wurden danach intensiv gemischt (REAX 1 D R, Heidolph Instruments GmbH) und die Ansätze für 15 – 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden in die Röhrchen jeweils 1 ml BD CellWASH™ (BD Biosciences) gegeben. Danach wurden die Ansätze allesamt für 5 min bei 700 g zentrifugiert (Hermle Z360K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland).

Anschließend wurde der Überstand bis auf ca. 200 μ l abgesaugt und im Anschluss mit 250 μ l BD CellWASH™ gewaschen. Danach wurden die Zellen mittels Vortexer resuspendiert.

Nun konnte mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Mit dem Röhrchen 1 wurde der Leerwert der Probe gemessen. In einem ersten Schritt musste in der FSC/SSC-Darstellung ein Gate gesetzt werden, um so die zu untersuchenden Blutplättchen darzustellen. Danach wurde mithilfe des Leerwertes ein Quadrant gesetzt („lower left“ LL, unterer linker Quadrant). Da der Leerwert gemessen wurde und keine Antikörper gegen Zellmembranstrukturen enthalten waren, ist der LL-Quadrant folglich sowohl für das Fluorochrom FITC (Fluoresceinisothiocyanat) als auch für das Fluorochrom PE (Phycoerythrin) negativ (siehe Abb. 11).



**Abb. 11: a) FSC/SSC-Darstellung des Leerwertes
b) Punktwolkendiagramm des Leerwertes mit gesetztem Quadranten**

Um eine optimale Fluoreszenzeinstellung zu garantieren wurden danach die Röhrchen 2 und 3 gemessen. Das Röhrchen 2 enthielt FITC-beladene Antikörper gegen das Zellmembranantigen CD42a. Das Fluorochrom FITC emittierte dabei grünes Licht. Die in den Durchflusszytometer eingebauten Fluoreszenzlichtdetektoren erfassten das emittierte Fluoreszenzlicht und wandelten dieses in elektrische Impulse um. Der FITC-positive Bereich befindet sich in dem unteren rechten Quadranten („lower right“ LR) (siehe Abb. 12 a)).

Die im Röhrchen 3 enthaltenen PE-beladenen Antikörper gegen das Membranantigen CD42b emittierten Licht in einer rötlichen Farbe und wurden im oberen linken Quadranten („upper left“ UL) detektiert (siehe Abb. 12 b)).

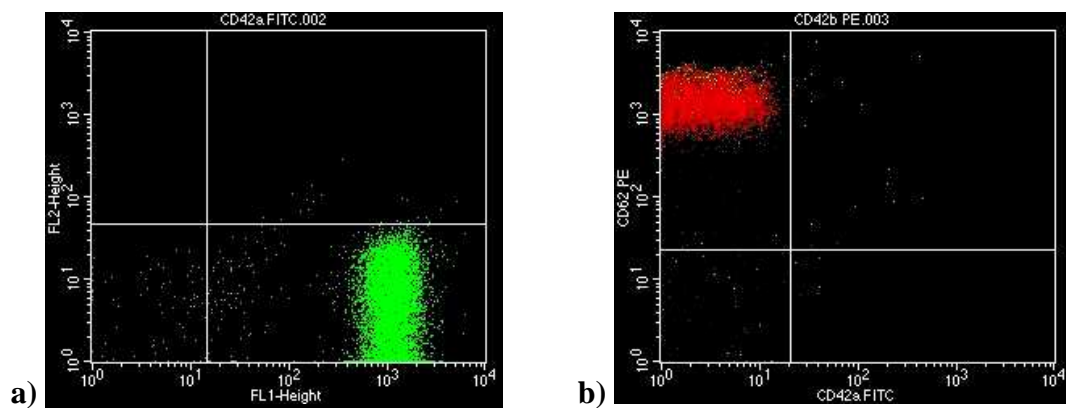


Abb. 12: Punktwolkendiagramm: a) CD42a-FITC-Ansatz b) CD42b-PE-Ansatz

Das Röhrchen 4 enthielt zum einen FITC-beladene Antikörper gegen das Antigen CD42a, das sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten Blutplättchen zu finden ist. Die in der Probe befindlichen Thrombozyten waren demnach alle FITC-positiv, sodass die Detektion in den rechten Quadranten stattfand. Zum anderen enthielt die fixierte Probe PE-beladene Antikörper

gegen das aktivierungsabhängige CD62P-Antigen. Waren die Blutplättchen aktiviert, exprimierten sie also CD62P-Antigen auf ihrer Zellmembran, emittierten diese zusätzlich eine rote Fluoreszenz, sodass die Blutplättchen im oberen rechten Quadranten („upper right“ UR) detektiert wurden. Nicht-aktivierte Thrombozyten wurden im LR-Quadranten gefunden (siehe Abb. 13).

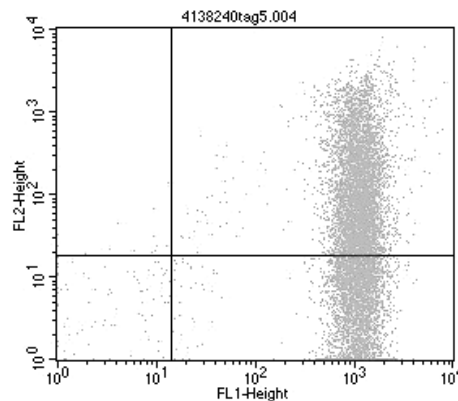


Abb. 13: Durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivierung mit CD42a-FITC- und CD62-PE-Antikörper

Dadurch konnte die Software mit folgender Formel die relative CD62P-Expression [%] im Verhältnis zur Gesamtzahl der gemessenen Blutplättchen berechnen:

$$CD62P = \frac{UR}{UR + LR} \times 100$$

3.7.10 Restleukozyten

Am Herstellungstag der Thrombozytenpräparate wurde die Restleukozytenzahl mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Auch für die Bestimmung der Leukozytenzahl des leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentrats wurde der Durchflusszytometer BD FACScan™ verwendet.

Das verwendete BD Leucocount™-Reagenz (BD Biosciences) enthält Propidiumdiodid. Das Propidiumdiodid wirkt als Nukleinsäureinterkalator und färbt daher kernhaltige Zellen, also auch Leukozyten an. Thrombozyten und Erythrozyten, die keine Zellkerne enthalten, werden nicht angefärbt. Das Reagenz enthält zudem spezifische RNasen zum Abbau von RNA in RNA-haltigen Zellen.

An allen Tagen, an denen die Restleukozytenzahl bestimmt worden ist, wurden durch ein Kontrollkit (BD Leucocount™ PLT Control Kit, BD Biosciences) zwei Kontrollmessungen mit einer bekannten Konzentration an Leukozyten durchgeführt.

Für die Messung wurden BD Trucount™-Röhrchen (BD Biosciences) verwendet. Diese enthalten einen lyophilisierten Pellet. Die darin enthaltenen Beads werden für die Bestimmung der Leukozytenzahl benötigt.

In ein BD Trucount™-Röhrchen wurden 100 µl der Probe pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Probe im Vorfeld gut durchmischt worden ist. Danach wurden 400 µl der Reagenzlösung in das Röhrchen pipettiert, vorsichtig durchmischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für mindestens 5 min inkubiert. Anschließend konnte die Probe mittels Durchflusszytometrie gemessen werden.

Das Areal R1 wurde im Voraus für die Beads, das Areal R2 für die Restleukozyten bestimmt (siehe dazu Abb. 14).

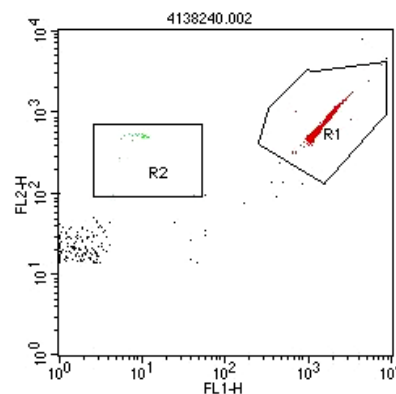


Abb. 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozytenzahl

Nach folgender Formel konnte die Software die Leukozytenkonzentration [1/µl] berechnen:

$$\text{Leukozytenkonzentration} = \frac{\text{Leukozytenereignisse (R2)}}{\text{Beadereignisse (R1)}} \times \frac{\text{chargenspezifische Partikelanzahl}}{\text{Volumen der gefärbten Probe [\mu l]}}$$

Für die Berechnung der Restleukozytenzahl des gesammelten TKs musste die berechnete Leukozytenkonzentration mit dem Volumen des Thrombozytenpräparates multipliziert werden.

3.7.11 Sterilität

Nach dem Ablauf der Haltbarkeit wurden die Thrombozytenpräparate ($n = 40$) auf mögliche bakterielle Kontaminationen getestet. Dazu wurde ein aerobes und anaerobes Kulturfläschen (BD BACTEC™ Plus Aerobic/F + Anaerobic/F, BD Biosciences) aus Casein-Soja-Pepton-Bouillon für jedes Präparat beimpft und in das Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums gesendet. In jedes Kulturfläschen wurden unter sterilen Bedingungen ca. 8 – 10 ml der zu untersuchenden Probe überführt. Die Kulturfläschen wurden sieben Tage inkubiert.

Die Fläschen wurden zur Untersuchung in das BD BACTEC™-Gerät (BD Biosciences) der Fluoreszenzserie gestellt.

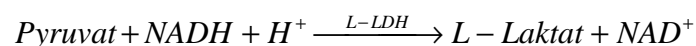
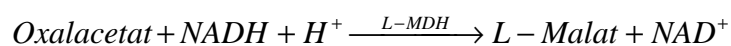
Falls eine bakterielle Kontamination vorliegt, kommt es durch das Wachstum von Bakterien zur Metabolisierung der in den Kulturfläschen befindlichen Substrate und zur Produktion von Kohlenstoffdioxid (CO_2). Die Kulturfläschen sind mit einem chemischen Sensor ausgestattet, der den Anstieg der CO_2 -Produktion messen kann. Das BD BACTEC™-Gerät überprüft alle zehn Minuten, ob der Sensor einen Fluoreszenzanstieg anzeigt. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zur produzierten CO_2 -Menge. Ein positiver Befund beweist die Anwesenheit lebensfähiger Mikroorganismen (Bakterien oder Hefepilze).

3.7.12 Citratgehalt

Der Nachweis von Citrat (Citronensäure) kann durch einen UV-Test mit der Messung der Extinktionsänderung erfolgen. In einem ersten Reaktionsschritt wird durch die Zugabe des Enzyms Citratlyase (CL) die Reaktion von Citrat zu Oxalacetat und Acetat katalysiert:



Durch die Zugabe der beiden Enzyme L-Malatdehydrogenase (L-MDH) und L-Laktatdehydrogenase (L-LDH) werden Oxalacetat und dessen Decarboxylierungsprodukt Pyruvat zu L-Malat und L-Laktat abgebaut:



Diese beiden Reaktionen verbrauchen reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und es entsteht NAD^+ . Die Abnahme von NADH kann aufgrund seiner spezifischen Absorption bei 334, 340 oder 365 nm gemessen werden. Die Menge des verbrauchten NADHs ist äquivalent zu der in der Probe enthaltenen Citratmenge und kann mithilfe der Extinktionsänderung mit einem Photometer gemessen werden.

Für die Messung des Citratgehaltes wurde an den drei Qualitätskontrolltagen jeweils 1 ml der aus dem TK entnommenen Probe in ein Eppendorfgefäß (Eppendorf AG) pipettiert und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nachdem alle Proben ($n = 120$) gesammelt waren, wurde zur Bestimmung des Citratgehaltes ein UV-Test durchgeführt (Enzytec™ Citronensäure, R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland).

Im Lieferumfang waren folgende Reagenzien enthalten:

- Flasche 1: ca. 1,4 g Lyophilisat (Glycylglycinpuffer, L-MDH, L-LDH, NADH)
- Flasche 2: 50 mg Lyophilisat (CL)
- Flasche 3: Citronensäure-Testkontrolllösung

Die Reagenzien mussten wie folgt verdünnt werden:

- Lösung 1: Inhalt der Flasche 1 + 12 ml bidestilliertes Wasser
- Lösung 2: Inhalt der Flasche 2 + 0,3 ml bidestilliertes Wasser

Vor der Messung mussten die eingefrorenen Proben aufgetaut werden. Dazu wurden die Proben in einem Wasserbad (Liquitherm FV, Clinicon International GmbH) auf Raumtemperatur gebracht und kurz gevortexet (REAX 1 D R, Heidolph Instruments GmbH). Für die Messung des Leerwertes sind 0,5 ml der Lösung 1 und 1 ml bidestilliertes Wasser in eine 510 K-Küvette (Eppendorf AG) pipettiert worden. In die Küvetten für die Proben- und die Testkontrollmessungen wurden 0,5 ml Lösung 1, 0,1 ml Proben- oder Testkontrolllösung und 0,9 ml bidestilliertes Wasser überführt. Danach wurde der Inhalt der Küvetten gemischt und nach ca. 5 min die Extinktionen der Lösungen gemessen (E_1). Die Extinktionen wurden mit dem Photometer MKE 5081 (Eppendorf AG) analysiert.

Nach der Zugabe von 10 μl der Lösung 2 und einer weiteren Inkubationszeit von ca. 5 min, wurden nochmals die Extinktionen gemessen (E_2).

Im Anschluss wurden die Extinktionsdifferenzen ($E_1 - E_2$) gemessen und von der Extinktionsdifferenz der Probe, die Extinktionsdifferenz des Leerwertes subtrahiert. Bei der Kontrollmes-

sung musste anstatt der Extinktionsdifferenz der Probe, die Extinktionsdifferenz der Kontrolllösung eingesetzt werden:

$$\Delta E = (E_1 - E_2)_{\text{Probe / Kontrolllösung}} - (E_1 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

Die Massenkonzentration (c) an Citrat [g/l] wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{V \times M}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \Delta E$$

V = Testvolumen (1,5 ml)

M = Molekulargewicht von Citrat (189,1 [g/mol])

Verdünnungsfaktor ($\times 10$)

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ ($6,18 [\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{l}^{-1}]$)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

v = Probevolumen (0,1 ml)

Die Umrechnung von der Massenkonzentration [g/l] in die Stoffmengenkonzentration [mmol/l] erfolgte durch einfache Division der Massenkonzentration durch das Molekulargewicht des Citrats.

3.8 Gammabestrahlung

Durch die Gammabestrahlungsanlage OB 29/4 STS (Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden die im Rahmen der Studie verwendeten Thrombozytenkonzentrate allesamt vor der Transfusion bestrahlt. Die Gammabestrahlung eines TKs soll die Entstehung einer transfusionsassoziierten Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung bei Risikopatienten vermeiden. Die Bestrahlung erfolgte mit einer mittleren Strahlendosis von 30 Gy über 850 s. Als Strahlenquelle fungierte das radioaktive Isotop ^{137}Cs .

3.9 Thrombozytentransfusion und Berechnung des korrigierten Inkrements

Die Patienten wurden im Vorfeld der Transfusion befragt, ob sie an der Studie teilnehmen möchten und entsprechend aufgeklärt. Ihre Einwilligung wurde in einer Einverständniserklärung festgehalten. Die Patienten wurden darüber informiert, dass bei der Teilnahme an der

Studie mindestens eine zusätzliche Blutentnahme 1 h nach der Transfusion nötig ist. Die Blutentnahme erfolgte entweder über die Punktion einer peripheren Cubitalvene oder durch einen bereits liegenden zentralen Venenkatheter. Bei der Blutabnahme durch einen zentralen Venenkatheter wurden die ersten 10 ml Blut verworfen. Alle sonstigen Blutwerte (Vorwerte, Nachwerte nach 18 – 24 h) die dokumentiert wurden, sind in der Regel im Rahmen der morgendlichen Routineblutentnahme erfasst worden.

Nach der Anforderung eines TKs wurden die Präparate schnellstmöglich auf Station gebracht und dort unter ständiger Agitation bei 22 ± 2 °C bis zur Transfusion gelagert.

Folgende Patientendaten wurden in diesem Teil der Studie erfasst und dokumentiert:

- AB0- und Rhesus-Blutgruppe
- Geschlecht
- Alter in vollständig beendeten Lebensjahren [a]
- Körpergröße [cm]
- Körpergewicht [kg]
- Plättchen-Vorwert (prä-PLT) [1/nl],
Hämatokrit-Vorwert (prä-Hkt) [%],
Leukozyten-Vorwert (prä-WBC) [1/nl]
- Plättchen-Nachwert nach 1 h (1h-post-PLT) [1/nl],
Hämatokrit-Nachwert nach 1 h (1h-post-Hkt) [%],
Leukozyten-Nachwert nach 1 h (1h-post-WBC) [1/nl]
- Plättchen-Nachwert nach 18 – 24 h (24h-post-PLT) [1/nl],
Hämatokrit-Nachwert nach 18 – 24 h (24h-post-Hkt) [%],
Leukozyten-Nachwert nach 18 – 24 h (24h-post-WBC) [1/nl]
- Diagnose des Patienten
- Fieber > 38 °C
- Vorliegen einer bakteriologischen Infektion
- Splenomegalie
- Amphotericin B-Medikation
- erneute Transfusion innerhalb 24 h nach der erfolgten TK-Transfusion
- Blutungen innerhalb 24 h nach der TK-Transfusion

Zusätzlich wurde die Lagerungszeit des Thrombozytenkonzentrats [d] erfasst, wobei der Herstellungstag des TKs als Tag 1 festgelegt wurde.

Aus diesen erfassten Daten wurden folgende Parameter dokumentiert bzw. berechnet:

- Transfusion Rhesus D-kompatibel/ -inkompatibel
- Transfusion AB0-identisch/ -majorkompatibel/ -minorkompatibel/ -inkompatibel
- Body-mass-Index [kg/m^2]
- Körperoberfläche (KOF) [m^2] nach der 1987 von Mosteller postulierten Methode (Mosteller-Formel; Mosteller RD, 1987):

$$KOF = \sqrt{\frac{\text{Körpergewicht}[\text{kg}] \times \text{Körpergröße}[\text{cm}]}{3600}}$$

- Inkrement [$1/\text{nl}$]:

$$\text{Inkrement} = (\text{post} - \text{PLT}) - (\text{prä} - \text{PLT})$$

- Korrigiertes Inkrement nach 1 h (1h-CCI) und nach 18 – 24 h (24h-CCI):

$$CCI = \frac{\text{Inkrement} \left[\frac{1}{\text{nl}} \right] \times KOF [\text{m}^2]}{\text{Plättchengehalt des transfundierten TKs} [\times 10^{11}]}$$

3.10 Spender- und Verfahrensdaten der Thrombozytapheresespender des Blutspendedienstes am Universitätsklinikum des Saarlandes

Um einen Überblick über den durchschnittlichen Thrombozytenabfall im Spenderblut während der Thrombozytapherese zu erhalten, wurden vor Beginn der Studie eine Vielzahl an Akten ($n = 910$) von Thrombozytenspendern retrospektiv ausgewertet. Die erfassten Parameter wurden jeweils nur einmal pro Spender von der zuletzt getätigten Apheresespende erhoben. Die Apheresespenden erfolgten unter Verwendung verschiedener Zellseparatoren (u.a. Trima Accel, Com.Tec, Amicus).

Folgende Spender- und Verfahrensdaten wurden erhoben:

- Anzahl gespendeter Thrombozytenkonzentrate
- Plättchen-Vorwert (prä-PLT) [1/nl]
- Plättchen-Nachwert (post-PLT) [1/nl]
- verarbeitetes Blutvolumen (VBV) [ml]
- Verfahrenszeit [min]

3.11 Statistische Analyse

Die Auswertung der erfassten Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 14.0 (SPSS Inc.).

Mithilfe einer deskriptiven Statistik wurde der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD), das Minimum (Min.) und das Maximum (Max.) für eine Vielzahl von Parametern berechnet.

Um zwischen den beiden Gruppen (Doppel-Apherese vs. Tripel-Apherese), und während der sechs konsekutiven Spenden innerhalb einer Gruppe, Signifikanzen aufzuzeigen, wurden die Parameter mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft und danach entweder ein parametrischer Test (t-Test bei gepaarten bzw. unabhängigen Stichproben) oder ein nicht-parametrischer Test (Wilcoxon-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Falls keine Normalverteilung vorlag und ein nicht-parametrischer Test angewandt wurde, ist dies im Ergebnisteil gesondert markiert worden ([#]). Vor der Analyse eines t-Tests bei unabhängigen Stichproben wurde zum Varianzvergleich der Levene-Test herangezogen. Bei der statistischen Analyse zur Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung im Rahmen der Qualitätskontrollen der TKs sowie bei der Evaluierung der Thrombozytenspendesituation am Universitätsklinikum wurde identisch vorgegangen.

Um signifikante Veränderungen hinsichtlich der Thrombopoetin-Vorwerte im Verlauf der sechs konsekutiven Spenden aufzuzeigen, wurde die univariate Varianzanalyse („analysis of variance“ ANOVA), getrennt nach der Aphereseart (Doppel-Apherese vs. Tripel-Apherese), verwendet.

Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen. Im Ergebnisteil wurden Signifikanzen markiert (*).

Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurden Kreis- und Liniendiagramme gezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Vor- und Nachbereitungszeit

Bei insgesamt 48 Tripel-Apheresen wurden sowohl die Vorbereitungszeit als auch die Nachbereitungszeit dokumentiert. Der Mittelwert für die Vorbereitungszeit betrug $1,7 \pm 0,5$ min. Die Nachbereitungszeit dauerte durchschnittlich $5,0 \pm 0,9$ min (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Vor- und Nachbereitungszeit bei der Tripel-Apherese-Spende

n = 48	MW \pm SD	Min. / Max.
Vorbereitungszeit [min]	$1,7 \pm 0,5$	1 / 2
Nachbereitungszeit [min]	$5,0 \pm 0,9$	4 / 7

4.2 Spenderdaten

Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 27 Spender rekrutiert. Ein Studienteilnehmer der Tripel-Apherese-Spender (n = 14) wurde bei der zweiten konsekutiven Spende von der weiteren Teilnahme an der Studie ausgeschlossen, da dieser mit einer gemessenen Thrombozytenkonzentration von 259/nl die im Protokoll definierte Mindestthrombozytenkonzentration von ≥ 260 /nl unterschritt. Alle anderen Studienteilnehmer durchliefen die sechs konsekutiven Spenden. Die überwiegende Zahl der Probanden (n = 17) war männlichen Geschlechts. Die Blutgruppen A Rhesus D positiv, 0 Rhesus D positiv und 0 Rhesus D negativ waren am häufigsten in den beiden Gruppen vertreten (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Spendercharakteristika (Geschlecht, AB0- und Rhesus-Blutgruppe)

Geschlecht	Tripel-Apherese-Spender n = 14	Doppel-Apherese-Spender n = 13
w	4 / 28,6 %	6 / 46,2 %
m	10 / 71,4 %	7 / 53,8 %
AB0- und Rhesus-Blutgruppe		
A Rhesus D positiv	3 / 21,4 %	5 / 38,5 %
0 Rhesus D positiv	8 / 57,1 %	2 / 15,4 %
B Rhesus D positiv	0 / 0 %	1 / 7,7 %
AB Rhesus D positiv	0 / 0 %	0 / 0 %
A Rhesus D negativ	1 / 7,1 %	0 / 0 %
0 Rhesus D negativ	2 / 14,3 %	4 / 30,8 %
B Rhesus D negativ	0 / 0 %	1 / 7,7 %
AB Rhesus D negativ	0 / 0 %	0 / 0 %

Die Spendercharakteristika wie Alter, Körpergewicht, Körpergröße, BMI und Gesamtblutvolumen wurden einmalig bei der ersten der sechs konsekutiven Spenden erhoben und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Das Durchschnittsalter aller Studienteilnehmer betrug 41 Jahre, der jüngste Teilnehmer war 21 Jahre und der Älteste hatte das 60. Lebensjahr vollendet (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Spendercharakteristika
(Alter, Körpergewicht, Körpergröße, BMI, Gesamtblutvolumen)**

	Tripel-Apherese-Spender n = 14		Doppel-Apherese-Spender n = 13		p-Wert
	MW \pm SD	Min. / Max.	MW \pm SD	Min. / Max.	
Alter [a]	39,9 \pm 13,8	23 / 60	42,5 \pm 10,0	21 / 52	0,581
Körpergewicht [kg]	89,9 \pm 13,3	68 / 112	82,7 \pm 22,1	60 / 130	0,313
Körpergröße [cm]	175,9 \pm 6,9	163 / 188	175,2 \pm 12,2	154 / 196	0,870
BMI [kg/m²]	29,2 \pm 5,0	22,0 / 41,4	26,6 \pm 4,7	21,1 / 33,8	0,184
GBV [l]	5,4 \pm 0,5	4,5 / 6,1	5,1 \pm 1,2	3,6 / 7,6	0,405

Der Mindestabstand zwischen den einzelnen Spenden wurde im Vorfeld auf 21 Tage für die Studienteilnehmer der Tripel-Apherese festgelegt. Für die Doppel-Apherese-Spender galt der etablierte Mindestabstand von 14 Tagen. Sowohl ein Spender in der Tripel-Apherese-Gruppe als auch ein Doppel-Apherese-Spender unterschritten den festgelegten Mindestabstand bei einer Spende um lediglich einen Tag und wurden in der Studie belassen.

Der Abstand zwischen zwei Spenden in der Gruppe der Tripel-Apherese betrug durchschnittlich 22,9 \pm 5,8 Tage. Die durchschnittliche Zeit zwischen zwei Apheresen bei den Doppel-Apherese-Spendern ergab einen Mittelwert von 15,5 \pm 3,7 Tagen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Spendeabstand, hämatologische Vor- und Nachwerte der Spender

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79		Doppel-Apherese-Spenden n = 78		p-Wert
	MW \pm SD	Min. / Max.	MW \pm SD	Min. / Max.	
Spendeabstand [d]	22,9 \pm 5,8	20 / 56	15,5 \pm 3,7	13 / 31	0,000* [#]
prä-PLT [1/nl]	322,4 \pm 32,6	261 / 428	267,3 \pm 33,9	204 / 355	0,000*
post-PLT [1/nl]	218,4 \pm 34,8	145 / 303	195,4 \pm 31,4	133 / 295	0,000*
prä-MPV [fl]	8,8 \pm 0,6	7,7 / 10,6	9,3 \pm 0,8	7,8 / 10,9	0,000*
post-MPV [fl]	8,8 \pm 0,6	7,6 / 10,3	9,3 \pm 0,9	7,7 / 11,2	0,000*
prä-Hkt [%]	41,2 \pm 2,1	33,2 / 46,0	38,9 \pm 2,8	32,3 / 44,7	0,000*
post-Hkt [%]	41,3 \pm 2,2	35,4 / 48,1	38,3 \pm 2,9	31,3 / 44,5	0,000*
prä-WBC [1/nl]	7,1 \pm 1,5	3,8 / 10,5	6,1 \pm 1,5	3,9 / 10,0	0,000*
post-WBC [1/nl]	7,8 \pm 1,9	4,5 / 13,5	6,3 \pm 1,8	3,5 / 12,5	0,000*
prä-TPO [pg/ml]	39,7 \pm 32,8	0,0 / 132,4	35,2 \pm 25,2	0,0 / 98,6	0,336
post-TPO [pg/ml]	42,6 \pm 29,9	0,0 / 138,6	36,4 \pm 26,3	0,0 / 105,8	0,173

Mann-Whitney-U-Test

Die vor der Spende gemessenen hämatologischen Vorwerte unterschieden sich, mit Ausnahme des Serum-Thrombopoetins, signifikant zwischen den beiden Gruppen. Die Plättchenkonzentration, der Hämatokrit und die Leukozytenkonzentration waren bei den Tripel-Apherese-Spendern signifikant höher, das mittlere Plättchenvolumen hingegen signifikant niedriger als bei den Doppel-Apherese-Spendern.

Die durchschnittliche Plättchenzahl betrug vor der Spende in der Gruppe der Tripel-Apherese $322,4 \pm 32,6/\text{nl}$, in der Gruppe der Doppel-Apherese-Spender $267,3 \pm 33,9/\text{nl}$. Die in beiden Gruppen gemessenen Plättchen-Nachwerte erfüllten alle die, nach den Richtlinien der BÄK, erforderliche Mindestthrombozytenzahl von $\geq 100/\text{nl}$ nach der Spende. Die niedrigste gemessene Plättchenkonzentration nach der Spende ergab in der Gruppe der Tripel-Apherese $145/\text{nl}$, in der Gruppe der Doppel-Apherese $133/\text{nl}$. Insgesamt wurde in der Gruppe der Tripel-Apherese lediglich einmal der untere Normalwert von $150/\text{nl}$ unterschritten. In der Gruppe der Doppel-Apherese-Spender wurde viermal ein $\text{post-PLT} < 150/\text{nl}$ gemessen. Im Durchschnitt wurde nach der Spende eine Thrombozytenkonzentration von $218,4 \pm 34,8/\text{nl}$ in der Tripel-Apherese-Gruppe und $195,4 \pm 31,4/\text{nl}$ in der Doppel-Apherese-Gruppe nachgewiesen.

Auch die nach der Thrombozytapherese gemessenen hämatologischen Werte ergaben signifikante Unterschiede zwischen den beiden Apherese-Gruppen. Das Serum-Thrombopoetin wies hingegen vergleichbare Konzentrationen auf ($p = 0,173$). Die Thrombozytenkonzentration, der Hämatokrit und die Leukozytenkonzentration zeigten auch nach der Spende signifikant höhere Werte in der Gruppe der Tripel-Apherese. Das mittlere Plättchenvolumen nach der Spende lag bei den Tripel-Apherese-Spendern signifikant niedriger vor.

Ein Vergleich der hämatologischen Vor- und Nachwerte in den beiden Apherese-Gruppen wird in der Tabelle 13 aufgezeigt.

Tabelle 13: Vergleich hämatologischer Vor- und Nachwerte innerhalb der beiden Apherese-Gruppen (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79 p-Wert	Doppel-Apherese-Spenden n = 78 p-Wert
prä-PLT vs. post-PLT	0,000*	0,000*
prä-WBC vs. post-WBC	0,000*	0,061
prä-MPV vs. post-MPV	0,773	0,749
prä-Hkt vs. post-Hkt	0,374	0,000*
prä-TPO vs. post-TPO	0,333	0,637

Das MPV und das TPO zeigten, unabhängig von der Aphereseart (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese), vergleichbare Werte vor und nach der Spende. Die PLT-Konzentration sank in beiden Gruppen signifikant ab. In der Gruppe der Tripel-Apherese konnte im Gegensatz zur Doppel-Apherese-Spende ein signifikanter Anstieg der Leukozyten aufgezeigt werden. Demgegenüber wurde in der Gruppe der Doppel-Apherese ein signifikanter Abfall des Hämatokrits festgestellt. Die Tripel-Apherese-Spender zeigten vergleichbare Hkt-Vor- und -Nachwerte ($p = 0,374$).

Da sich die hämatologischen Vorwerte in den beiden Gruppen größtenteils signifikant voneinander unterschieden, kann mithilfe der Differenzen aus den hämatologischen Vor- und Nachwerten gezeigt werden, ob sich die beiden Gruppen hinsichtlich eines Anstiegs oder Abfalls der gemessenen Laborparameter unterscheiden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Bildung der Differenz aus hämatologischen Vor- und Nachwerten (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79		Doppel-Apherese-Spenden n = 78		p-Wert
	MW \pm SD	Min. / Max.	MW \pm SD	Min. / Max.	
prä-PLT – post-PLT [1/nl]	104,0 \pm 21,0	52 / 163	71,9 \pm 22,1	14 / 121	0,000*
prä-MPV – post-MPV [fl]	0,0 \pm 0,4	- 1,2 / 1,4	- 0,1 \pm 0,4	- 0,9 / 0,9	0,980
prä-WBC – post-WBC [1/nl]	- 0,7 \pm 1,0	- 3,7 / 0,7	- 0,2 \pm 1,1	- 6,0 / 1,1	0,000* [#]
prä-Hkt – post-Hkt [%]	- 0,1 \pm 1,0	- 3,3 / 2,2	0,6 \pm 1,2	- 4,0 / 4,6	0,000*
prä-TPO – post-TPO [pg/ml]	- 2,9 \pm 26,1	- 54,8 / 79,9	- 1,2 \pm 22,4	- 66,9 / 54,6	0,363 [#]

Mann-Whitney-U-Test

In der Gruppe der Tripel-Apherese konnte ein im Vergleich zur Doppel-Apherese signifikant stärkerer Abfall der Thrombozytenkonzentration nachgewiesen werden. Bezüglich des Thrombopoetins konnten keine signifikanten Veränderungen im direkten Vergleich der beiden Gruppen während der Spende evaluiert werden. Durch den Vergleich der Hkt-Vor- und Hkt-Nachwerte konnte ein signifikanter Abfall des Hämatokrits in der Gruppe der Doppel-Apherese im Vergleich zur Tripel-Apherese-Gruppe dargelegt werden. Der Anstieg der Leukozyten war bei den Tripel-Apherese-Spenden signifikant größer als bei den Doppel-Apherese-Spenden.

Tabelle 15 zeigt die mittleren TPO-Konzentrationen über alle Spender vor dem 1. – 6. Spendetetermin getrennt nach Aphereseart.

Der Serum-TPO-Spiegel vor der Spende schwankte in den beiden Apherese-Gruppen zwischen 0,0 und 132,4 pg/ml (MW \pm SD: 37,5 \pm 29,3 pg/ml). Ein Vergleich der einzelnen Spenden zwischen den beiden Apherese-Gruppen konnte lediglich bei der dritten konsekutiven Spende eine Signifikanz aufdecken ($p = 0,019$).

Tabelle 15: Vorwerte des Serum-Thrombopoetins an den einzelnen Spendeterminen (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)

prä-TPO	Tripel-Apherese-Spenden		n = 79	Doppel-Apherese-Spenden		n = 78	p-Wert
	MW \pm SD	Min. / Max.		MW \pm SD	Min. / Max.		
1. Spende	29,1 \pm 30,2	0,0 / 97,4	n = 14	40,7 \pm 23,4	0,0 / 71,5	n = 13	0,280
2. Spende	54,7 \pm 30,8 ^{**)}	0,0 / 124,9	n = 13	40,4 \pm 21,7	1,3 / 72,6	n = 13	0,183
3. Spende	52,2 \pm 37,4	0,0 / 116,7	n = 13	22,5 \pm 17,8 ^{***)}	0,9 / 68,3	n = 13	0,019 [*]
4. Spende	49,3 \pm 36,7	0,0 / 132,4	n = 13	51,9 \pm 31,6	0,0 / 98,6	n = 13	0,853
5. Spende	17,0 \pm 15,1	0,0 / 50,1	n = 13	25,9 \pm 20,6	0,0 / 74,0	n = 13	0,221
6. Spende	36,8 \pm 29,7	0,0 / 116,0	n = 13	30,0 \pm 25,5	0,0 / 87,1	n = 13	0,540

^{**)} p = 0,040 zur 5. Spende; ^{***)} p = 0,037 zur 4. Spende;

Die univariate Varianzanalyse der Thrombopoetin-Vorwerte zwischen den einzelnen Spenden ergab in der Gruppe der Tripel-Apherese lediglich zwischen dem zweiten und fünften Spendetermin einen signifikanten Unterschied ($p = 0,040$). In der Doppel-Apherese-Gruppe konnte einzig zwischen der dritten und vierten Spende eine Signifikanz gezeigt werden ($p = 0,037$). Es lässt sich weder eine Tendenz bezüglich des TPO-Spiegels während der sechs konsekutiven Spenden innerhalb einer Apherese-Gruppe, noch klare Abweichungen zwischen den beiden Gruppen aufzeigen.

In der Abb. 15 sind die TPO-Vorwerte für jeden einzelnen Tripel-Apherese-Spender ($n = 13$) an den sechs aufeinander folgenden Spendeterminen dargestellt.

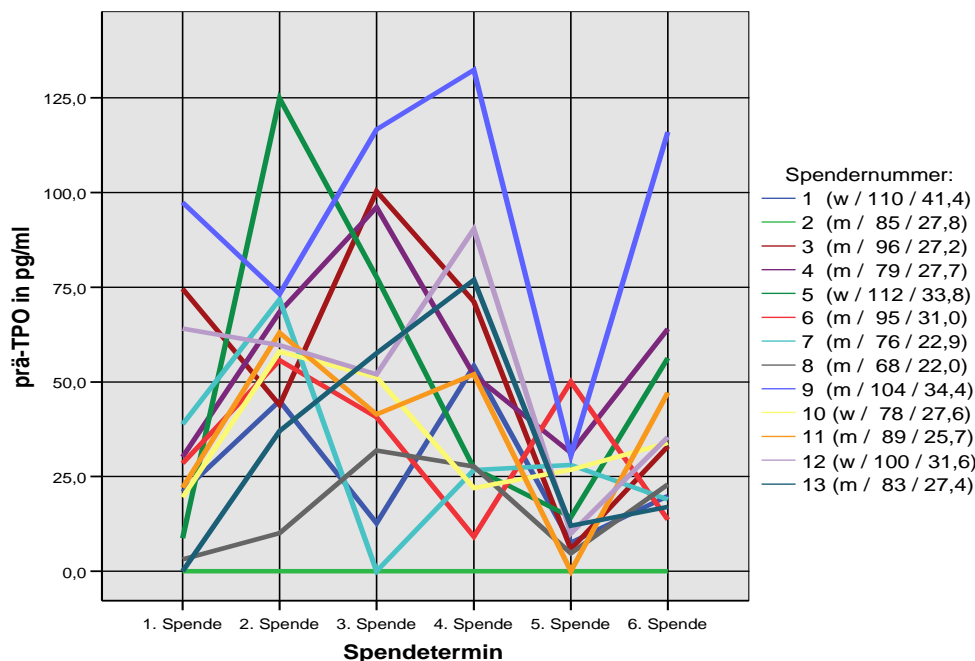


Abb. 15: Vorwerte des Serum-Thrombopoetins bei den Tripel-Apherese-Spendern ($n = 13$) an den einzelnen Spendeterminen (Angaben in Klammern: Geschlecht, Körpergewicht in kg und BMI in kg/m^2)

Der Tripel-Apherese-Spender, der an dem zweiten konsekutiven Spendetermin von der weiteren Teilnahme an der Studie ausgeschlossen wurde, blieb in der Grafik unberücksichtigt. Nach der Spendernummer sind in Klammern weitere Angaben zu dem Tripel-Apherese-Spender aufgelistet (Geschlecht, Körpergewicht in kg und BMI in kg/m^2).

Bei dem Tripel-Apherese-Spender mit der Spendernummer 2 konnte bei keinem einzigen Spendetermin eine TPO-Konzentration im Messbereich der Methode nachgewiesen werden. Auch die nach der Apherese gemessenen TPO-Spiegel lagen bei diesem Spender allesamt unter der Nachweisgrenze. Die Mehrzahl der Tripel-Apherese-Spender ($n = 9$) stiegen mit ihren TPO-Spiegeln bis zu dem zweiten Spendetermin an. Der Spender mit der Spendernummer 5 wies vor dem zweiten Spendetermin einen um 116,2 pg/ml höheren TPO-Spiegel auf, als vor der ersten Tripel-Apherese. Ein Tripel-Apherese-Spender (Spendernummer 13) zeigte einen kontinuierlichen Anstieg des prä-TPOs von der ersten Spende (0,0 pg/ml) bis zu dem vierten Spendetermin (76,9 pg/ml). Auffallend war der Abfall des Serum-TPOs bei den meisten Tripel-Apherese-Spendern ($n = 9$) vor dem fünften Spendetermin. Insgesamt war in der Tripel-Apherese-Gruppe aber kein einheitlicher TPO-Verlauf zwischen den Spenden über den Untersuchungszeitraum zu beobachten.

Die TPO-Vorwerte für die einzelnen Doppel-Apherese-Spender ($n = 13$) zeigten an den sechs konsekutiven Spenden ebenfalls keinen einheitlichen Verlauf (siehe Abb. 16).

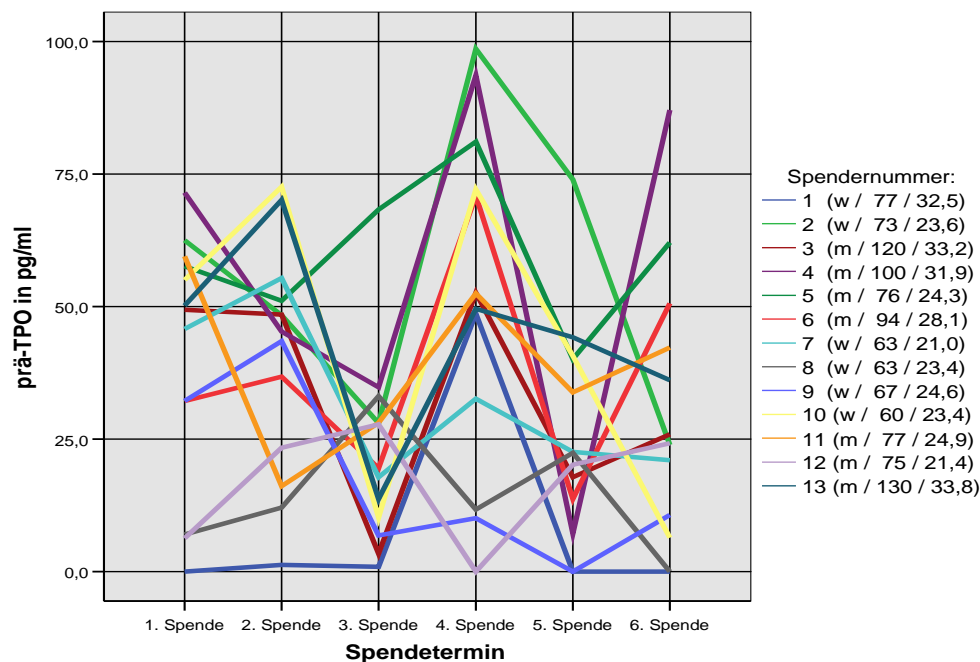


Abb. 16: Vorwerte des Serum-Thrombopoetins bei den Doppel-Apherese-Spendern ($n = 13$) an den einzelnen Spendeterminen (Angaben in Klammern: Geschlecht, Körpergewicht in kg und BMI in kg/m^2)

4.3 Verfahrensdaten

Es ergaben sich bei den Verfahrensdaten eindeutige signifikante Unterschiede zwischen den beiden Apherese-Gruppen hinsichtlich des verarbeiteten Blutvolumens, der von dem Trima Accel-Sammelsystem gemachten Volumenangabe des gesammelten TKs und der Verfahrenszeit sowie der gemessenen PLT-Konzentration des TKs (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Verfahrensdaten (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese)

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79		Doppel-Apherese-Spenden n = 78		p-Wert
	MW \pm SD	Min. / Max.	MW \pm SD	Min. / Max.	
Geräteangabe VBV [ml]	4283,2 \pm 491,4	3201 / 5536	3216,2 \pm 391,4	2356 / 4013	0,000*
Geräteangabe Volumen des TKs [ml]	661,1 \pm 2,2	659 / 670	497,7 \pm 14,8	450 / 510	0,000* [#]
Geräteangabe Verfahrenszeit [min]	76,5 \pm 9,2	57 / 102	60,9 \pm 7,9	47 / 79	0,000*
gemessene PLT-Konzentration des TKs [1/nl]	1212,4 \pm 104,2	1008 / 1460	1049,2 \pm 114,0	808 / 1299	0,000*

Mann-Whitney-U-Test

Die durchschnittliche PLT-Konzentration (MW \pm SD: 1212,4 \pm 104,2/nl) bei den Tripel-Apheresen stimmte genau mit der im Vorfeld der Studie in der Geräteeinstellung eingegebenen, gewünschten PLT-Konzentration von 1212/nl überein.

Die gemessene Verfahrenszeit zur Spende eines Dreifach-TKs (MW \pm SD: 76,5 \pm 9,2 min) war im Vergleich zur Spende eines Doppel-TKs (MW \pm SD: 60,9 \pm 7,9 min) im Durchschnitt etwa 16 min länger. Die minimal gemessene Verfahrenszeit zur Spende eines Dreifach-TKs betrug 57 min, die maximal gemessene Separationszeit betrug 102 min.

In der Tripel-Apherese-Gruppe wurden weitere Verfahrensdaten erhoben (Tabelle 17).

Tabelle 17: Verfahrensdaten der Tripel-Apherese-Spenden

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79	
	MW \pm SD	Min. / Max.
Geräteangabe kalkulierte Verfahrenszeit [min]	75,6 \pm 8,9	58 / 100
Geräteangabe ACD-Gesamtverbrauch [ml]	464,5 \pm 53,7	342 / 605
Geräteangabe AK an Spender [ml]	358,7 \pm 53,8	240 / 502
berechnete ACD-Infusionsrate [ml/min/l]	0,87 \pm 0,09	0,57 / 1,03
gemessenes TK-Volumen [ml]	674,2 \pm 9,8	652,1 / 709,1
gemessener PLT-Ertrag [$\times 10^{11}$]	8,2 \pm 0,7	6,7 / 10,0

Mithilfe der kalkulierten Verfahrenszeit, des berechneten TK-Volumens und des gemessenen PLT-Ertrages konnten Angaben zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel gemacht werden. Der ACD-Gesamtverbrauch betrug in dieser Gruppe durchschnittlich 464,5 ml. Aus der abgelesenen AK-Menge an den Spender (MW \pm SD: 358,7 \pm 53,8 ml) konnte die ACD-Infusionsrate berechnet werden. Die durchschnittliche ACD-Infusionsrate ergab 0,87 ml/min/l und schwankte in einem Bereich von 0,57 – 1,03 ml/min/l.

In der Gruppe der Tripel-Apherese wurden die Studienteilnehmer nach jeder Spende befragt, ob während der Thrombozytapherese citratspezifische Nebenwirkungen auftraten. Diese wurden wie beschrieben klassifiziert (Tabelle 18).

Tabelle 18: Citratspezifische Nebenwirkungen bei der Tripel-Apherese-Spende (McLeod-Kriterien nach Bueno JL et al., 2005)

citratspezifische Nebenwirkungen nach Bueno JL et al., 2005	Tripel-Apherese-Spenden n = 79
Grad 0	63 / 79,7 %
Grad 1	12 / 15,2 %
Grad 2	3 / 3,8 %
Grad 3	1 / 1,8 %
Grad 4	0 / 0 %
Grad 5	0 / 0 %

Bei knapp 80 % der Apheresen (n = 63) kam es zu keinen citratspezifischen Nebenwirkungen (Grad 0). Während 15,2 % der Tripel-Apherese-Spenden (n = 12) wurden leichte citratspezifische Nebenwirkungen (Grad 1) angegeben. Diese Nebenwirkungen zeigten sich in der überwiegenden Zahl als leichte periorale Parästhesien. Bei 3,8 % der Tripel-Apheresen (n = 3) persistierten die citratspezifischen Nebenwirkungen trotz der Gabe einer 500 mg Calciumtablette (Grad 2). Lediglich ein Studienteilnehmer litt während der Spende kurzzeitig an Schüttelfrost und Übelkeit (Grad 3). Diese Symptomatik verbesserte sich im weiteren Verlauf, so dass die Apherese nicht vorzeitig abgebrochen werden musste.

Insgesamt wurde bei 14 Tripel-Apheresen eine orale Calciumapplikation durchgeführt.

Die Berechnung der Sammlungsrate der Plättchen für die durchgeführten Tripel-Apheresen ergab einen Mittelwert von 6,5 \pm 0,8 [$\times 10^{11}$ /h]. Die minimale Sammlungsrate betrug 4,8 [$\times 10^{11}$ /h], die maximale Sammlungsrate 8,8 [$\times 10^{11}$ /h]. Die Sammlungseffizienz schwankte zwischen 58,6 – 84,9 % (MW \pm SD: 71,5 \pm 5,7 %). Die Zeit zum Sammeln für die Standarddosis von 8,0 [$\times 10^{11}$] Plättchen dauerte durchschnittlich 75,2 \pm 9,0 min. Der Schwankungsbereich der TSD 8,0 lag bei 54,4 – 99,4 min (Tabelle 19).

Tabelle 19: Sammlungsrate, Sammlungseffizienz und Zeit für die Standarddosis der Tripel-Apherese-Spenden

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79	
	MW \pm SD	Min. / Max.
Sammlungsrate (CR) [$\times 10^{11}$ /h]	6,5 \pm 0,8	4,8 / 8,8
Sammlungseffizienz (CE) [%]	71,5 \pm 5,7	58,6 / 84,9
Zeit für die Standarddosis (TSD 8,0) [min]	75,2 \pm 9,0	54,4 / 99,4

Mithilfe der erfassten Daten aus der Tripel-Apherese-Spende (Tabelle 16 und 17) konnten Angaben zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel gemacht werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Angaben zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel bei den Tripel-Apherese-Spenden

	Tripel-Apherese-Spenden n = 79	
	MW \pm SD	Min. / Max.
Gerätegenauigkeit Verfahrenszeit [min] (maschinell gemessene Verfahrenszeit – Geräteangabe kalkulierte Verfahrenszeit)	0,9 \pm 1,4	- 1 / 6
Gerätegenauigkeit TK-Volumen [ml] (gemessenes TK-Volumen – Geräteangabe gesammeltes TK-Volumen)	13,1 \pm 9,5	- 7,9 / 13,1
Gerätegenauigkeit PLT-Ertrag [$\times 10^{11}$] (gemessener PLT-Ertrag – 8,0 [$\times 10^{11}$])	0,2 \pm 0,7	- 1,3 / 2,0
Gerätegenauigkeit PLT-Konzentration [1/nl] (gemessene PLT-Konzentration – 1212 [1/nl])	0,4 \pm 104,2	- 204 / 248

Das Trima Accel-System berichtete in gut der Hälfte der Tripel-Apheresen (n = 46) von einer zu geringen kalkulierten Verfahrenszeit im Vergleich zur maschinell gemessenen Verfahrenszeit. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 58,2 % an allen Apheresen. In 27,8 % der Apheresen (n = 22) stimmte die kalkulierte Verfahrenszeit mit der tatsächlich gemessenen Verfahrenszeit überein. Lediglich bei 13,9 % der Apheresen (n = 11) wurde die Verfahrenszeit um eine Minute zu hoch geschätzt. Das Verfahren dauerte im Durchschnitt knapp eine Minute (MW \pm SD: 0,9 \pm 1,4 min) länger als kalkuliert.

Der Mittelwert des von der Trima Accel angegebenen TK-Volumens betrug 661,1 ml, das tatsächlich gemessene TK-Volumen lag mit 674,2 ml durchschnittlich 13,1 ml über dem kalkulierten TK-Volumen. Das gemessene TK-Volumen schwankte zwischen 652,1 – 709,1 ml. Der Zellseparator Trima Accel unterschätzte bei 97,5 % der Tripel-Apheresen (n = 77) das produzierte TK-Volumen. Bei einer Apherese stimmte das von der Trima Accel angegebene

TK-Volumen mit dem gemessenen TK-Volumen überein. Das Trima Accel-System überschätzte lediglich bei einer Tripel-Apherese das produzierte TK-Volumen.

Der gemessene PLT-Ertrag lag im Durchschnitt bei $8,2 \pm 0,7 [\times 10^{11}]$. Somit wurde der PLT-Ertrag von dem Apheresesystem eher unterschätzt. In 43,0 % der Apheresen ($n = 34$) wurde ein niedrigerer PLT-Ertrag als der Zielertrag von $8,0 [\times 10^{11}]$ ermittelt. Hingegen wurde bei 57,0 % der Tripel-Apheresen ($n = 45$) der Zielertrag übertroffen.

4.4 Evaluierung des Spenderkomforts

Zur Evaluierung des Spenderkomforts wurden die Tripel-Apherese-Spender gebeten, eine Bewertung hinsichtlich des allgemeinen Wohlbefindens sowie des Entnahme- und Rückflusses während der letzten sechs konsekutiven Spenden abzugeben. Da ein Spender von der weiteren Teilnahme an der Studie ausgeschlossen wurde, nahmen an der Befragung, die nach der sechsten konsekutiven Spende stattfand, lediglich 13 Studienteilnehmer teil.

Von allen Spendern ($n = 13$) wurden die Fragen mit „ausgezeichnet“ oder „gut“ beantwortet. Mithilfe von Kreisdiagrammen sind in Abb. 17 die Ergebnisse dieser Befragung dargestellt.

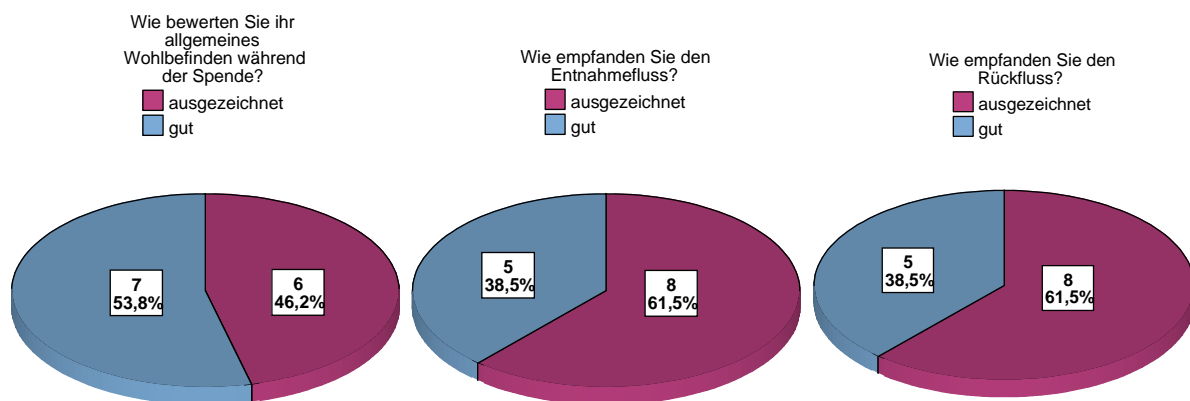


Abb. 17: Evaluierung des Spenderkomforts

Weiterhin wurden vier Fragen bezüglich des Spendeverfahrens bewertet. Die kurze Dauer des Spendeverfahrens, die Verträglichkeit des Verfahrens, die Flussgeschwindigkeit sowie die Spende im Einarm-Verfahren wurden von den Studienteilnehmern der Tripel-Apherese beurteilt. Die Ergebnisse der Befragung sind in Abb. 18 mithilfe von Kreisdiagrammen dargestellt.

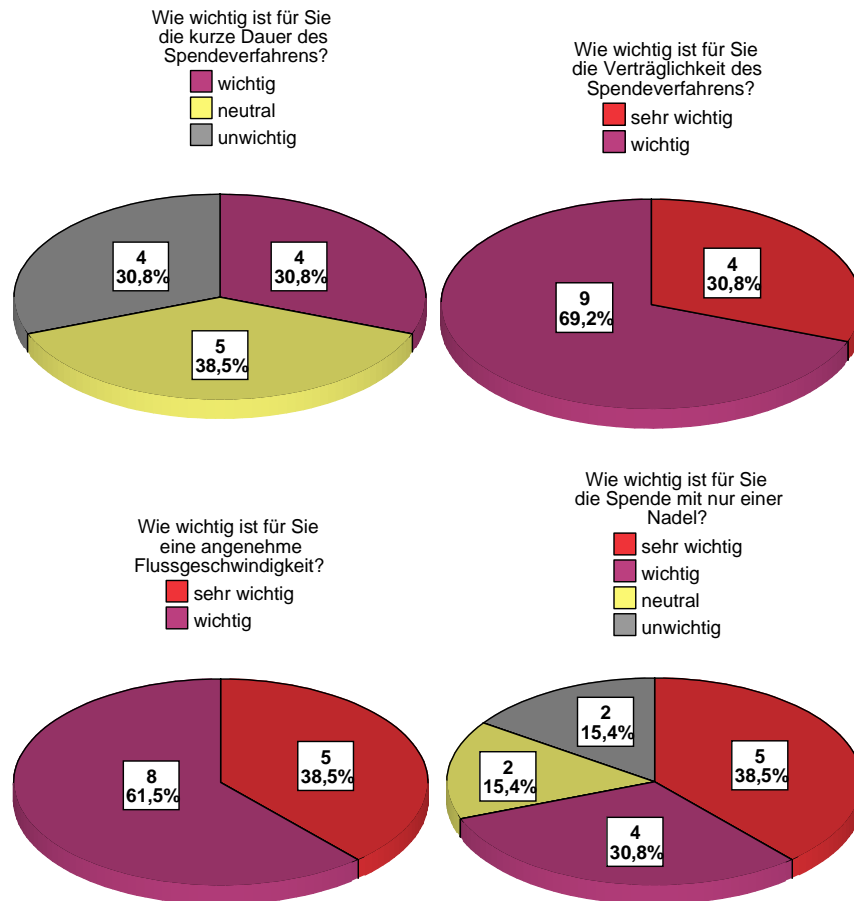


Abb. 18: Evaluierung des Spendeverfahrens

Die kurze Dauer des Spendeverfahrens war lediglich für vier der befragten Spender von hohem Stellenwert.

Sowohl die Verträglichkeit des Verfahrens als auch eine angenehme Flussgeschwindigkeit waren für alle Spender ($n = 13$) „wichtig“ bzw. „sehr wichtig“.

Bei der Frage nach dem bevorzugten Spendeverfahren (Einarm-Verfahren vs. Zweiarm-Verfahren) wurde von dem Großteil der Befragten ($n = 9$) das Einarm-Verfahren bevorzugt. Zwei der Tripel-Apherese-Spender zeigten keine Präferenz bezüglich eines Verfahrens.

4.5 Evaluierung des Operatorenkomforts

Am Ende der Studie wurden die an der Studie beteiligten Operatoren ($n = 9$) bezüglich der Zufriedenheit mit dem verwendeten Trima Accel-System befragt.

Das Auf- und Abrüsten des Zellseparators sowie die Menüführung wurden von allen Operatoren mit „ausgezeichnet“ bzw. „gut“ bewertet.

Lediglich die Durchführung des Sammelverfahrens wurde von einem Operator mit „befriedigend“ und die Bearbeitung von Fehlermeldungen von zwei Operatoren mit „befriedigend“ beurteilt. Alle anderen Operatoren evaluierten auch diese beiden Fragen mit „ausgezeichnet“ bzw. „gut“ (siehe Abb. 19).



Abb. 19: Evaluierung des Operatorenkomforts

4.6 Qualitätskontrolle

4.6.1 Allgemeines

Die Tripel-Apherese-Spender ($n = 14$) spendeten im Laufe der Studie $n = 237$ Thrombozytenkonzentrate. Ein Spender unterschritt vor dem zweiten Spendetermin die Mindestthrombozytenkonzentration von $\geq 260/\text{nl}$, sodass dieser lediglich drei TKs spendete und von der weiteren Teilnahme an der hiesigen Studie ausgeschlossen wurde. Alle anderen Tripel-Apherese-Spender ($n = 13$) leisteten an allen sechs Spendeterminen jeweils drei TKs. Insgesamt wurden im Rahmen der Studie an 40 Thrombozytenpräparaten Qualitätskontrollen durchgeführt. Es sollten dadurch genügend Datensätze erfasst werden, um die Zulassung der Dreifach-Thrombozytapheresespende bei der Zulassungsbehörde zu erlangen.

Die Qualitätskontrollen wurden ab der dritten konsekutiven Thrombozytenspende durchgeführt. Dabei wurden bei zehn Spendern, jeweils bei der dritten, vierten und fünften Tripel-Apherese, insgesamt 30 Datensätze erhoben. Bei einem Thrombozytenspender wurden lediglich zwei Qualitätskontrollen an dem dritten und vierten Spendetermin durchgeführt. Acht weitere Qualitätskontrollen wurden bei zwei Spendern bei der dritten, vierten, fünften und sechsten Tripel-Apherese generiert.

4.6.2 Konzentratvolumen, Thrombozytenkonzentration, Plättchenzahl pro Einheit und mittleres Plättchenvolumen

Im Rahmen der Qualitätskontrollen wurden am Herstellungstag (Tag 1) sowie an Tag 5 und Tag 7 das Konzentratvolumen vor und nach der Probenentnahme, die PLT-Konzentration und das mittlere Plättchenvolumen des TKs bestimmt. Außerdem wurde die in dem Präparat enthaltene Plättchenzahl berechnet.

Wie aus den Tabellen 21, 22 und 23 zu erkennen ist, nahm das Konzentratvolumen von Tag 1 auf Tag 5 sowie von Tag 5 auf Tag 7 signifikant ab. Das durchschnittliche Konzentratvolumen betrug nach der Herstellung an Tag 1 $224,5 \pm 4,4$ ml. Im Durchschnitt nahm das Volumen, unter Berücksichtigung der Probenentnahme, über die Lagerungsdauer bis zu Tag 7 um $3,9 \pm 0,7$ ml ab. Diese Tatsache lässt sich durch die Durchlässigkeit des Präparatebeutels für das in Stoffwechselprozessen entstehende CO_2 erklären.

**Tabelle 21: Qualitätskontrolle
(Konzentratvolumen vor und nach Probenentnahme,
PLT-Konzentration, PLT/ Einheit, MPV)**

	Tag	Qualitätskontrollen n = 40	
		MW \pm SD	Min. / Max.
Konzentratvolumen vor Probenentnahme [ml]	1	224,5 \pm 4,4	211,1 / 231,8
	5	209,0 \pm 4,6	194,4 / 216,9
	7	192,7 \pm 4,9	177,5 / 199,9
Konzentratvolumen nach Probenentnahme [ml]	1	211,5 \pm 4,6	197,1 / 219,5
	5	194,0 \pm 4,9	178,7 / 201,2
	7	180,0 \pm 5,1	165,3 / 187,3
PLT-Konzentration [1/nl]	1	1196,7 \pm 103,0	1008 / 1454
	5	1158,9 \pm 92,4	1000 / 1429
	7	1131,4 \pm 99,3	942 / 1458
PLT/ Einheit [$\times 10^{11}$]	1	2,7 \pm 0,2	2,3 / 3,1
	5	2,4 \pm 0,2	2,1 / 2,8
	7	2,2 \pm 0,2	1,8 / 2,6
MPV [fl]	1	7,17 \pm 0,47	6,3 / 8,2
	5	7,20 \pm 0,43	6,4 / 8,1
	7	7,29 \pm 0,41	6,6 / 8,1

Tabelle 22: Berechnung der Abnahme des Konzentratvolumens während der Lagerung unter Berücksichtigung der Probenentnahme

	Tag	Qualitätskontrollen n = 40	
		MW \pm SD	Min. / Max.
Differenz Konzentratvolumen [ml]	1 – 5	2,6 \pm 0,5	1,9 / 4,4
	5 – 7	1,3 \pm 0,4	1,0 / 3,3
	1 – 7	3,9 \pm 0,7	3,2 / 6,6

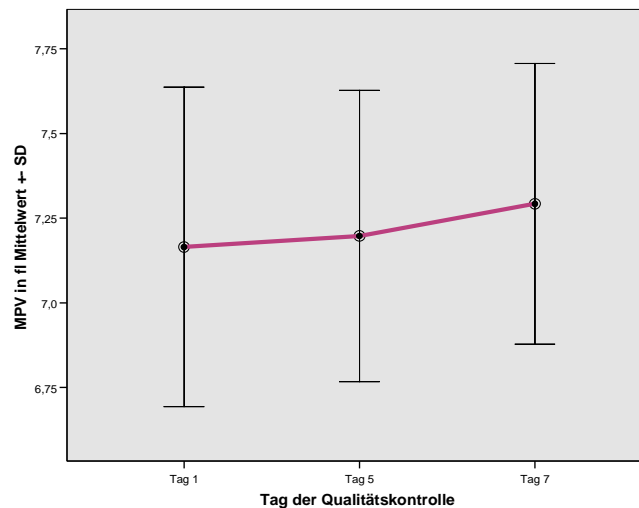
Während der Lagerung der Thrombozytenpräparate nahm die PLT-Konzentration über alle Messpunkte signifikant ab.

Mithilfe des Konzentratvolumens und der PLT-Konzentration konnte die Plättchenzahl des Konzentrats berechnet werden. Der Mittelwert der Plättchen pro Einheit nahm von Tag 1 (MW \pm SD: 2,7 \pm 0,2 [$\times 10^{11}$]) über die gesamte Lagerungszeit, auch bedingt durch die erfolgte Probenentnahme, signifikant ab.

Das MPV nahm mit der Lagerungsdauer zu. Dabei zeigten die TKs an Tag 1 und Tag 5 vergleichbare Werte ($p = 0,272$), von Tag 5 auf Tag 7 sowie bei Betrachtung über die gesamte Lagerungsdauer (Tag 1 vs. Tag 7) konnte hingegen eine signifikante Zunahme des MPVs nachgewiesen werden. In Abb. 20 ist der Mittelwert \pm SD des mittleren Plättchenvolumens während der Lagerung anhand eines Liniendiagrammes dargestellt.

Tabelle 23: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung I

	Tag	p-Wert
Konzentratvolumen [ml]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*
PLT-Konzentration [1/nl]	1 vs. 5	0,003*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*
PLT/ Einheit [$\times 10^{11}$]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*
MPV [fl]	1 vs. 5	0,272
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,002*

**Abb. 20: Entwicklung des MPVs während der Lagerung**

4.6.3 Swirling, Aggregatbildung, pH-Wert und Citratgehalt

In der Tabelle 24 ist die Entwicklung des Swirling-Phänomens, des pH-Wertes und der Citratkonzentration über die Lagerungsdauer dargestellt. Die Tabelle 25 zeigt die gemessenen signifikanten Veränderungen der Parameter während der Lagerungszeit.

Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 5 und Tag 7 wurden alle Thrombozytenpräparate auf das Vorhandensein von Aggregatbildungen untersucht. In keinem Präparat wurde eine Aggregatbildung beobachtet.

Tabelle 24: Qualitätskontrolle (Swirling, pH-Wert, Citrat)

	Tag	Qualitätskontrollen n = 40	
		MW \pm SD	Min. / Max.
Swirling	1	3,0 \pm 0,0	3 / 3
	5	2,8 \pm 0,4	2 / 3
	7	2,5 \pm 0,7	1 / 3
pH-Wert	1	7,3 \pm 0,1	7,1 / 7,6
	5	7,5 \pm 0,1	7,3 / 7,7
	7	7,4 \pm 0,1	7,1 / 7,7
Citrat [mmol/l]	1	17,9 \pm 1,6	15,9 / 23,5
	5	18,1 \pm 1,9	15,5 / 24,3
	7	18,2 \pm 2,1	16,2 / 24,9

Tabelle 25: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung II

	Tag	p-Wert
Swirling	1 vs. 5	0,005* [#]
	5 vs. 7	0,001* [#]
	1 vs. 7	0,000* [#]
pH-Wert	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,001*
Citrat [mmol/l]	1 vs. 5	0,250 [#]
	5 vs. 7	0,582 [#]
	1 vs. 7	0,100 [#]

Wilcoxon-Test

Das Swirling-Phänomen wurde an allen drei Untersuchungstagen erfasst und nahm über die Lagerungszeit von Tag 1 auf Tag 5 ($p = 0,005$) und von Tag 5 auf Tag 7 ($p = 0,001$) signifikant ab. Am Herstellungstag wiesen alle Thrombozytenkonzentrate ($n = 40$) die typische wolkige Opaleszenz auf und wurden allesamt mit Grad 3 bewertet. Während der Lagerung nahm der „swirling effect“ bis zu Tag 5 der Lagerung auf durchschnittlich $2,8 \pm 0,4$ ab. Die Thrombozytenpräparate wurden größtenteils ($n = 32$) weiterhin mit Grad 3 evaluiert. Die restlichen TKs ($n = 8$) erhielten eine Bewertung des Swirling-Phänomens von Grad 2. An Tag 7 wurde das Swirling-Phänomen im Durchschnitt mit $2,5 \pm 0,7$ bewertet, wobei weiterhin der größte Anteil der Präparate ein Swirling-Phänomen mit Grad 3 aufwies ($n = 23$). Die restlichen Präparate wurden mit Grad 2 ($n = 13$) und mit Grad 1 ($n = 4$) bewertet.

Der pH-Wert zeigte einen unterschiedlichen Verlauf während der Lagerungszeit. Der mittlere gemessene pH-Wert an Tag 1 wies einen Wert von $7,3 \pm 0,1$ auf. Die Entwicklung des pH-Wertes von Tag 1 auf Tag 7 offenbarte einen signifikanten Anstieg ($p = 0,001$). Ein Vergleich der pH-Werte an Tag 1 mit den pH-Werten an Tag 5 (MW \pm SD: $7,5 \pm 0,1$) konnte einen signifikanten Anstieg darlegen ($p = 0,000$). Der niedrigste gemessene pH-Wert an Tag 5 betrug

7,3, der höchste pH-Wert 7,7. Die Entwicklung des pH-Wertes von Tag 5 auf Tag 7 war wiederum rückläufig und zeigte eine signifikante Abnahme ($p = 0,000$). Im Durchschnitt konnte an Tag 7 ein pH-Wert von $7,4 \pm 0,1$ mit einer Schwankungsbreite von 7,1 – 7,7 erhoben werden. Die Abb. 21 zeigt den Mittelwertverlauf \pm SD des pH-Wertes während der Lagerung anhand eines Liniendiagrammes.

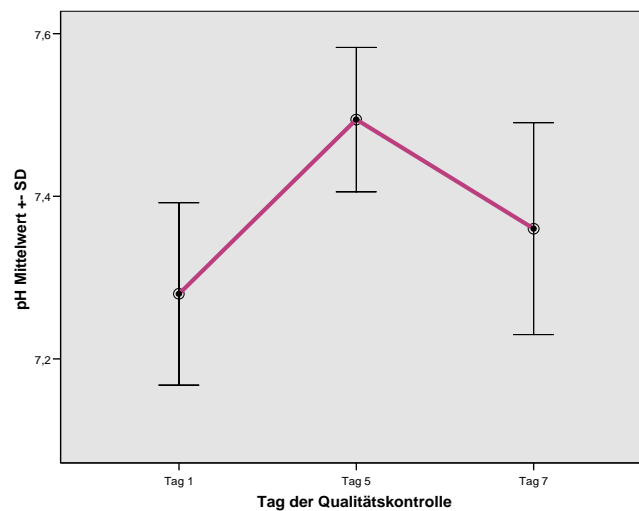


Abb. 21: Entwicklung des pH-Wertes während der Lagerung

Ein Vergleich der Citratkonzentrationen an Tag 1, Tag 5 und Tag 7 zeigte über die gesamte Lagerungszeit keine signifikanten Veränderungen. Der Mittelwert der Citratkonzentration an Tag 1 ergab $17,9 \pm 1,6$ mmol/l. An Tag 7 wurde ein vergleichbarer Mittelwert von $18,2 \pm 2,1$ mmol/l zu Tag 1 gemessen ($p = 0,100$).

4.6.4 Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase

In Tabelle 26 ist der Verlauf der Glukose-, Laktat- und LDH-Konzentration über den Lagerungszeitraum aufgelistet.

Bei Betrachtung der Glukosekonzentrationen von Tag 1 über Tag 5 hin zu Tag 7 konnte eine signifikante Abnahme registriert werden (siehe Tabelle 27). Dabei fiel die durchschnittliche Konzentration von 343,0 mg/dl an Tag 1 auf 232,3 mg/dl an Tag 7.

Tabelle 26: Qualitätskontrolle (Glukose, Laktat, LDH)

	Tag	Qualitätskontrollen n = 40	
		MW \pm SD	Min. / Max.
Glukose [mg/dl]	1	343,0 \pm 26,3	304 / 427
	5	274,8 \pm 30,7	220 / 361
	7	232,3 \pm 35,2	169 / 306
Laktat [mmol/l]	1	1,7 \pm 0,4	0,8 / 2,6
	5	8,8 \pm 1,2	6,5 / 11,5
	7	13,1 \pm 2,2	9,6 / 17,8
LDH [U/l]	1	123,0 \pm 30,8	19 / 192
	5	162,0 \pm 34,2	100 / 249
	7	170,1 \pm 34,6	106 / 258

Tabelle 27: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung III

	Tag	p-Wert
Glukose [mg/dl]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*
Laktat [mmol/l]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*
LDH [U/l]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*

Die Laktatkonzentration nahm während der Lagerung signifikant zu. Die durchschnittliche Konzentration an Tag 1 von 1,7 \pm 0,4 mmol/l stieg über Tag 5 (MW \pm SD: 8,8 \pm 1,2 mmol/l) auf 13,1 \pm 2,2 mmol/l an Tag 7 an.

Die Messung der LDH-Konzentration zeigte einen ähnlichen Verlauf. Auch die LDH-Konzentration nahm während der Lagerung signifikant zu. An Tag 1 wurde eine im Durchschnitt bei 123,0 U/l liegende Enzymaktivität gemessen. Diese stieg bis zu Tag 7 auf einen mittleren Wert von 170,1 U/l an.

4.6.5 Resterythrozyten, Restleukozyten und Sterilität

Im Rahmen der Qualitätskontrollen wurden alle Produkte (n = 40) an Tag 1 auf die in dem Konzentrat befindlichen Resterythrozyten und -leukozyten hin untersucht.

Die Bestimmung der Erythrozytenzahl erfolgte durch manuelle Auszählung in der Neubauer-kammer. Wie aus Tabelle 28 zu erkennen ist, wiesen die Thrombozytenpräparate eine durchschnittliche Resterythrozytenzahl pro Einheit von 0,01 \pm 0,03 [$\times 10^9$] auf.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die genaue Restleukozytenzahl im jeweiligen Präparat bestimmt. Im Durchschnitt konnten $0,08 \pm 0,09 [\times 10^6]$ Leukozyten in einer Einheit nachgewiesen werden.

Alle TKs ($n = 40$), die am Ende der Haltbarkeit (Tag 7) auf eine mögliche bakterielle Kontamination hin untersucht wurden, erfüllten die Sterilitätskriterien und zeigten allesamt einen negativen Befund.

Tabelle 28: Qualitätskontrolle (Resterythrozyten, Restleukozyten)

	Tag	Qualitätskontrollen $n = 40$	
		MW \pm SD	Min. / Max.
Resterythrozyten/ Einheit [$\times 10^9$]	1	$0,01 \pm 0,03$	0 / 0,16
Restleukozyten/ Einheit [$\times 10^6$]	1	$0,08 \pm 0,09$	0 / 0,47

4.6.6 Thrombozytenaktivierung mittels CD62P, ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozyten auf das CD62P-Antigen und die ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation erfolgten sowohl am Herstellungstag als auch an den Lagerungstagen 5 und 7 (Tabellen 29 und 30).

Die Expression des CD62P-Antigens nahm stetig über alle Messpunkte signifikant zu. An Tag 1 wiesen im Mittel $21,2 \pm 5,8$ % der Blutplättchen das CD62P-Antigen in ihrer Zellmembran auf. Die minimal gemessene Expression am Tag der Herstellung betrug in einem TK 13,1 %, die maximale Expression wurde in einem TK mit 34,8 % angegeben. An Tag 7 waren durchschnittlich $61,6 \pm 7,3$ % der Blutplättchen CD62P-positiv (Min. / Max.: 42,3 / 75,2 %).

Tabelle 29: Qualitätskontrolle (CD62P, ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation)

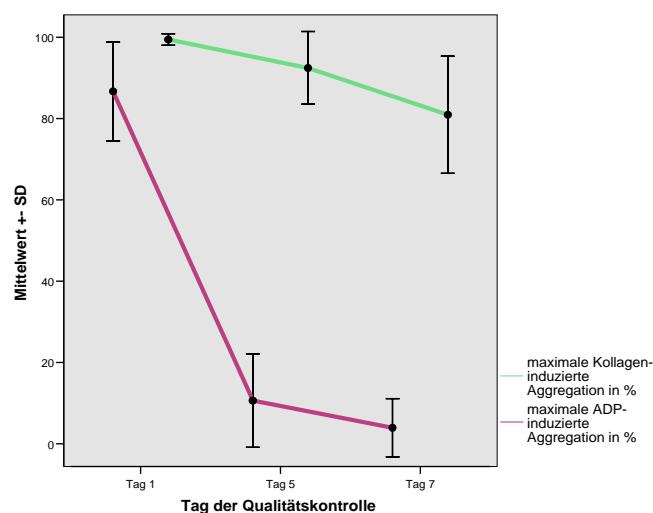
	Tag	Qualitätskontrollen $n = 40$	
		MW \pm SD	Min. / Max.
CD62P [%]	1	$21,2 \pm 5,8$	13,1 / 34,8
	5	$46,6 \pm 10,7$	26,1 / 70,8
	7	$61,6 \pm 7,3$	42,3 / 75,2
ADP-induzierte Aggregation [%]	1	$86,7 \pm 12,2$	55 / 100
	5	$10,7 \pm 11,5$	0 / 42
	7	$3,9 \pm 7,2$	0 / 34
Kollagen-induzierte Aggregation [%]	1	$99,5 \pm 1,4$	94 / 100
	5	$92,5 \pm 8,9$	64 / 100
	7	$81,0 \pm 14,4$	27 / 100

Tabelle 30: Berechnung signifikanter Unterschiede während der Lagerung IV

	Tag	p-Wert
CD62P [%]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000*
ADP-induzierte Aggregation [%]	1 vs. 5	0,000*
	5 vs. 7	0,000* [#]
	1 vs. 7	0,000* [#]
Kollagen-induzierte Aggregation [%]	1 vs. 5	0,000* [#]
	5 vs. 7	0,000*
	1 vs. 7	0,000* [#]

[#] Wilcoxon-Test

Sowohl die ADP- als auch die Kollagen-induzierte Aggregation nahmen während der Lagerung über Tag 5 auf Tag 7 signifikant ab. Während der siebentägigen Lagerung war die Abnahme der ADP-induzierten Aggregation signifikant ausgeprägter als die Abnahme der Kollagen-induzierten Aggregation. An Tag 1 konnte eine durchschnittliche ADP-induzierte Aggregation von $86,7 \pm 12,2$ % aufgezeigt werden. Diese nahm bis zu Tag 7 im Mittel um 82,8 % ab. Die Kollagen-induzierte Aggregation am Herstellungstag (MW \pm SD: $99,5 \pm 1,4$ %) nahm bis zu Tag 7 (MW \pm SD: $81,0 \pm 14,4$ %) nur um durchschnittlich 18,5 % ab. In Abb. 22 sind die Mittelwerte \pm SD der gemessenen Aggregationen (ADP vs. Kollagen) in einem Liniendiagramm dargestellt.

**Abb. 22: Entwicklung der ADP- und Kollagen-induzierten-Aggregation während der Lagerung**

4.6.7 Abweichungen von den Prüfkriterien für leukozytendepletierte

Apherese-Thrombozytenkonzentrate

Die Prüfkriterien für leukozytendepletierte Apherese-Thrombozytenkonzentrate (nach den aktuell geltenden Richtlinien der BÄK, 2010) wurden unter 2.3.3 beschrieben und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Alle Produkte erfüllten das nach der Herstellung gemessene Mindestvolumen von 210 ml (MW \pm SD: 224,5 \pm 4,4 ml). Das gemessene Volumen hatte eine Schwankungsbreite von minimal 211,1 ml bis hin zu einem Maximalvolumen von 231,8 ml.

Der vorgeschriebene Thrombozytengehalt von $> 2 \times 10^{11}$ / Einheit konnte sowohl am Herstellungstag als auch am Ende der Haltbarkeit (Tag 5) von allen TKs eingehalten werden, obwohl für die Berechnung des Thrombozytengehaltes an Tag 5 die Probenentnahme am Herstellungstag unberücksichtigt blieb. Der Thrombozytengehalt betrug durchschnittlich $2,7 \pm 0,2$ [$\times 10^{11}$] pro Einheit an Tag 1 (Min. / Max.: 2,3 / 3,1 [$\times 10^{11}$]).

Die an Tag 1 ermittelten Restleukozytenzahlen der Präparate unterschritten alle die maximal zulässige Zahl von $< 1 \times 10^6$ pro Einheit. Der maximal ermittelte Restleukozytengehalt ergab 0,47 [$\times 10^6$] in einem TK.

Auch die maximal zulässige Resterythrozytenzahl von $< 3 \times 10^9$ / Einheit wurde von keinem TK überschritten. Die maximal gezählte Erythrozytenzahl lag in einem Präparat bei 0,16 [$\times 10^9$].

Die am Ende der Haltbarkeit überprüfte wolkige Opaleszenz (Swirling-Phänomen) konnte bei allen Produkten nachgewiesen werden. Obwohl das Swirling-Phänomen über die gesamte Lagerungsdauer signifikant abnahm, fehlte bei keinem Produkt weder an Tag 5 noch an Tag 7 das Swirling-Phänomen.

Die Sterilitätskriterien wurden von allen Produkten eingehalten.

Nach den Prüfkriterien der BÄK sollte der am Ende der Haltbarkeit zu messende pH-Wert in einem Bereich von 6,4 – 7,8 liegen und 90 % der untersuchten TKs einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,6 aufweisen. Alle an Tag 5 und an Tag 7 gemessenen pH-Werte lagen in dem vorgeschriebenen Bereich.

Zusammenfassend konnten die produzierten TKs (n = 40) alle Prüfkriterien erfüllen.

4.7 Thrombozytentransfusion und Berechnung des korrigierten Inkrements

Insgesamt wurden 46 TKs aus der Tripel-Apherese-Spende an 17 verschiedene hämato-onkologische Patienten transfundiert. In der statistischen Auswertung wurden 43 Transfusionen evaluiert, da drei Patienten mit zwei TKs von einem Spender direkt nacheinander transfundiert worden sind. Diese Tatsache wurde bei der Berechnung des korrigierten Inkrements berücksichtigt.

Außer den in Tabelle 31 aufgelisteten Patientencharakteristika wurden bei allen im Rahmen der Studie durchgeführten Transfusionen weitere transfusionsrelevante Parameter erfasst (siehe Tabelle 32).

Es wurden 60,5 % der Thrombozytenpräparate ($n = 26$) AB0-identisch transfundiert. Die restlichen Transfusionen waren entweder AB0-major- oder AB0-minorkompatibel ($n = 17$). Die meisten Thrombozytentransfusionen ($n = 41$) wurden Rhesus D-kompatibel verabreicht.

Tabelle 31: Patientencharakteristika

	Patienten $n = 17$	
	MW \pm SD	Min. / Max.
Alter [a]	50,1 \pm 18,3	18 / 74
Körpergewicht [kg]	77,2 \pm 25,0	53 / 160
Körpergröße [cm]	171,8 \pm 11,0	151 / 188
BMI [kg/m²]	26,0 \pm 6,9	18,5 / 47,8
KOF [m²]	1,9 \pm 0,3	1,5 / 2,9
Geschlecht		
w	6 / 35,3 %	
m	11 / 64,7 %	
Erkrankung		
NHL	9 / 52,9 %	
AML	5 / 29,4 %	
ALL	3 / 17,6 %	
AB0- und Rhesus-Blutgruppe		
A Rhesus D positiv	6 / 35,3 %	
0 Rhesus D positiv	6 / 35,3 %	
B Rhesus D positiv	0 / 0 %	
AB Rhesus D positiv	1 / 5,9 %	
A Rhesus D negativ	1 / 5,9 %	
0 Rhesus D negativ	2 / 11,8 %	
B Rhesus D negativ	0 / 0 %	
AB Rhesus D negativ	1 / 5,9 %	

Tabelle 32: Transfusionsrelevante Parameter

Transfusion AB0-	Transfusionen n = 43
identisch	26 / 60,5 %
majorkompatibel	15 / 34,9 %
minorkompatibel	2 / 4,7 %
Transfusion Rhesus D-	
kompatibel	41 / 95,3 %
inkompatibel	2 / 4,7 %
Körpertemperatur > 38 °C	
ja	11 / 25,6 %
nein	32 / 74,4 %
bakterielle Infektion	
ja	6 / 14,0 %
nein	37 / 86,0 %
Splenomegalie	
ja	0 / 0 %
nein	43 / 100 %
Amphotericin B-Medikation	
ja	34 / 79,1 %
nein	9 / 20,9 %
Blutungen < 24 h	
ja	0 / 0 %
nein	43 / 100 %
erneute Transfusion < 24 h	
ja	0 / 0 %
nein	43 / 100 %

Wie aus der Tabelle 33 zu erkennen ist, betrug die durchschnittliche Lagerungszeit der Präparate vor der Transfusion $3,7 \pm 0,8$ Tage, wobei der Herstellungstag als Tag 1 definiert wurde. Insgesamt wurden 23 TKs innerhalb der ersten drei Tage transfundiert. Die restlichen Thrombozytenpräparate (n = 23) wurden erst am vierten bzw. fünften Tag angefordert. Der mittlere Plättchengehalt pro Einheit betrug $2,7 \pm 0,2 [\times 10^{11}]$.

Das berechnete korrigierte Inkrement nach 1 h ergab einen Durchschnittswert von 12,4 mit einer Schwankungsbreite von 0,0 – 27,8. Nach 18 – 24 h wurde das CCI erneut bestimmt (MW \pm SD: $4,9 \pm 7,5$). Es konnte eine Schwankungsbreite von - 11,0 – 25,8 gezeigt werden. Ein Refraktärzustand nach 1 h lag damit bei insgesamt 11 Patienten vor (1h-CCI < 7,5). Nach 18 – 24 h zeigten 23 Patienten eine Refraktärität (24h-CCI < 4,5).

Um eventuelle Tendenzen bezüglich des Transfusionserfolges in Abhängigkeit von bestimmten Parametern (AB0-Blutgruppe, Amphotericin B-Medikation, Körpertemperatur, bakterielle Infektion, Lagerungszeit) aufzuzeigen, wurde das korrigierte Inkrement nach 18 – 24 h aufgeschlüsselt (siehe Tabelle 34).

Tabelle 33: Lagerungszeit der TKs vor Transfusion, hämatologische Vor- und Nachwerte und korrigiertes Inkrement der Patienten

	Transfusionen n = 43	
	MW \pm SD	Min. / Max.
Lagerungszeit [d]	3,7 \pm 0,8	3 / 5
PLT/ Einheit [$\times 10^{11}$]	2,7 \pm 0,2	2,2 / 3,2
prä-PLT [1/nl]	18,5 \pm 10,0	5 / 45
prä-Hkt [%]	28,7 \pm 4,4	20,0 / 37,0
prä-WBC [1/nl]	1,2 \pm 2,4	0,0 / 14,7
1h-post-PLT [1/nl]	38,9 \pm 14,5	14 / 66
1h-post-Hkt [%]	26,9 \pm 4,6	19,4 / 37,8
1h-post-WBC [1/nl]	1,3 \pm 2,2	0,0 / 11,8
1h-CCI	12,4 \pm 6,0	0,0 / 27,8
24h-post-PLT [1/nl]	26,3 \pm 14,9	7 / 58
24h-post-Hkt [%]	30,0 \pm 4,4	23,0 / 40,0
24h-post-WBC [1/nl]	1,3 \pm 2,4	0,0 / 14,8
24h-CCI	4,9 \pm 7,5	- 11,0 / 25,8

Es zeigten sich Tendenzen zu einem erhöhten korrigierten Inkrement bei einer AB0-identischen Transfusion (MW \pm SD: 5,1 \pm 5,9). Sowohl eine Amphotericin B-Medikation als auch eine Erhöhung der Körpertemperatur wirkten sich tendenziell nachteilig aus. Das 24h-CCI bei Patienten mit bakteriellen Infektionen fiel auch tendenziell niedriger aus. Weiterhin offenbarte eine kürzere Lagerungszeit von ≤ 3 d (MW \pm SD: 6,1 \pm 7,8) eine Tendenz zu einem höheren 24h-CCI als bei einer Lagerung von > 3 d (MW \pm SD: 3,6 \pm 7,2).

Tabelle 34: Aufschlüsselung des korrigierten Inkrements nach 18 – 24 h (24h-CCI)

Transfusion AB0-	24h-CCI
	MW \pm SD
major-/ minorkompatibel	4,5 \pm 9,7
identisch	5,1 \pm 5,9
Körpertemperatur > 38 °C	
ja	1,4 \pm 5,7
nein	6,1 \pm 7,8
bakterielle Infektion	
ja	4,1 \pm 6,0
nein	5,0 \pm 7,8
Amphotericin B-Medikation	
ja	4,5 \pm 6,9
nein	6,3 \pm 9,9
Lagerungszeit > 3 d	
ja	3,6 \pm 7,2
nein	6,1 \pm 7,8

4.8 Spender- und Verfahrensdaten der Thrombozytapheresespender des Blutspendedienstes am Universitätsklinikum des Saarlandes

Tabelle 35 zeigt einen Überblick über die Thrombozyten-Spendesituation an der Universitätsklinik des Saarlandes.

Die Spenderakten wurden getrennt nach der Anzahl gespendeter Thrombozytenkonzentrate (Einfach-Apherese vs. Doppel-Apherese) statistisch analysiert. Mithilfe der Differenz aus dem Plättchen-Vorwert und dem Plättchen-Nachwert konnte der durchschnittliche Thrombozytenkonzentrationsabfall berechnet werden.

Tabelle 35: Thrombozyten-Spendesituation der Universitätsklinik des Saarlandes

	Einfach-Apherese-Spender n = 236		Doppel-Apherese-Spender n = 674		p-Wert
	MW \pm SD	Min. / Max.	MW \pm SD	Min. / Max.	
prä-PLT [1/nl]	204,2 \pm 36,0	152 / 368	267,5 \pm 43,4	163 / 469	0,000* [#]
post-PLT [1/nl]	157,8 \pm 33,0	88 / 287	187,0 \pm 37,7	76 / 347	0,000* [#]
VBV [ml]	2818,1 \pm 453,6	1374 / 4819	3557,5 \pm 649,5	1928 / 5440	0,000*
Verfahrenszeit [min]	55,2 \pm 7,2	34 / 77	62,9 \pm 9,2	40 / 94	0,000*
prä-PLT – post-PLT [1/nl]	46,7 \pm 21,0	3 / 188	80,6 \pm 25,8	- 31 / 191	0,000*

Mann-Whitney-U-Test

Die Spender, die jeweils ein TK während einem Spendetermin leisteten, hatten im Mittel ein prä-PLT von 204,2 \pm 36,0/nl. Bei einer durchschnittlichen Verfahrenszeit von 55 min und einem verarbeiteten Blutvolumen von 2818 ml, wiesen diese Spender im Durchschnitt ein post-PLT von etwa 158/nl auf.

Im Gegensatz dazu betrug der Plättchen-Vorwert in der Gruppe der Doppel-Apherese-Spender im Durchschnitt 267,5 \pm 43,4/nl. Sowohl die durchschnittliche Verfahrenszeit von 63 min als auch das durchschnittlich verarbeitete Blutvolumen von 3558 ml waren signifikant höher als im Einfach-TK-Spenderkollektiv.

Der durchschnittliche Abfall der Plättchenkonzentration (prä-PLT – post-PLT) während der Spende zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Einfach-Apherese-Spendern (MW \pm SD: 46,7 \pm 21,0/nl) und den Doppel-Apherese-Spendern (MW \pm SD: 80,6 \pm 25,8/nl).

5. Diskussion

5.1 Thrombozytapherese

Aufgrund des medizinischen Fortschritts, der demographischen Entwicklung und der zunehmend intensivierten Behandlung hämato-onkologischer Erkrankungen kommt es zu einem steigenden Bedarf an Thrombozytentransfusionen (Zingsem J et al., 2004; Gross H, 2007; Greinacher A et al., 2007).

Thrombozytapheresen werden heutzutage in der Regel als Doppel-Apheresen zur Gewinnung von zwei Thrombozytenpräparaten während einer Spende durchgeführt. Durch die Auftrennung des gesammelten Plättchenkonzentrats auf zwei therapeutische Einheiten können dadurch zwei Patienten versorgt werden (Vassallo RR Jr et al., 2004).

Bedingt durch die Weiterentwicklung der eingesetzten Zellseparatoren ist es möglich geworden, unter Beachtung bestimmter Mindeststandards und der Spendersicherheit, Dreifach-TKS während einer Spende herzustellen (Picker SM et al., 2006b; Strauss RG, 2003; Winters JL, 2006; Moog R et al., 2008; Richa E et al., 2008; Moog R, 2009; Fontana S et al., 2011).

Bisher liegen nur sehr wenige Publikationen zur Dreifach-Thrombozytapherese vor.

Die hiesige Studie wurde an Zellseparatoren mit dem Trima Accel-System unter Verwendung der Softwareversion 5.1 durchgeführt. Einen Überblick über Publikationen bezüglich der Spender- und Verfahrensdaten unter Verwendung der Trima Accel gibt die Tabelle 36 wieder. Zu beachten ist dabei, dass die publizierten Daten fast alle mit der älteren Softwareversion 5.0 erhoben wurden.

5.1.1 Spenderdaten

Die Auswertung der Veränderung hämatologischer Parameter während der Apheresespende stellt eine wichtige Maßnahme zur Evaluierung der Spendersicherheit dar. Dazu wurden in der durchgeführten Studie u. a. Veränderungen der Thrombozytenkonzentration, des mittleren Plättchenvolumens und der Thrombopoetinkonzentration im Spenderblut, getrennt nach der Aphereseart (Tripel-Apherese vs. Doppel-Apherese), erfasst.

Tabelle 36: Spender- und Verfahrensdaten publizierter Arbeiten

	n	Zell-separator	PLT-Ertrag [$\times 10^{11}$]	prä-PLT vs. post-PLT [1/nl]	VBV [ml]	Verfahrens-zeit [min]	CIR [ml/min/l]	CE [%]	CR [$\times 10^{11}/h$]
Moog R et al., 2008	1132	Trima Accel >> (Com.Tec, Amicus, Spectra, Haemonetics MCS+)	7,88 \pm 1,33	333 \pm 46 vs. 223 \pm 46	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	1037		5,83 \pm 1,18	330 \pm 43 vs. 243 \pm 41	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset
Moog R, 2009	480	Trima Accel 5.0	7,2 – 9,0	303 \pm 64 vs. 195 \pm 49	4900 \pm 732	86 \pm 15	\emptyset	\emptyset	\emptyset
Picker SM et al., 2006b	4	Trima Accel 5.0	7,66 \pm 0,70	- 31,7 \pm 7,3 %	4406 \pm 411 ¹⁾	77,2 \pm 16,3 ²⁾	0,95 \pm 0,07	72,4 \pm 4,8	6,72 \pm 0,78
	4		5,97 \pm 0,16	- 30,0 \pm 6,7 %	3449 \pm 300 ¹⁾	62,6 \pm 7,7 ²⁾	1,09 \pm 0,07	76,6 \pm 0,9	6,42 \pm 0,72
Burgstaler EA et al., 2004	26	Trima Accel 5.0	6,7 \pm 1,7	259 \pm 38 vs. 199 \pm 36	3795 \pm 655	73 \pm 17	\emptyset	75,9 \pm 9,7	5,4 \pm 1,2
Fontana S et al., 2006	59	Trima Accel 5.0	7,48 (6,95 – 8,01)	\emptyset	4331 (4148 – 4514) ³⁾	79 (76 – 82)	\emptyset	\emptyset	5,68 (5,33 – 6,03)
Ringwald J et al., 2003*	20	Trima Accel 5.0	3,39 \pm 0,44	249 \pm 47 vs. 215 \pm 47	\emptyset	38,9 \pm 5,7	0,86 \pm 0,17	70,80 \pm 7,84	5,28 \pm 0,88
Bueno JL et al., 2005*	51	Trima Accel 5.0	3,85 \pm 0,10	244 \pm 5 vs. 196 \pm 4	\emptyset	56,9 \pm 1,7	0,73 \pm 0,02 ⁴⁾	65,6 \pm 2,9	4,26 \pm 0,11
Flesch BK et al., 2010	91	Trima Accel 5.01	6,0 \pm 0,7	- 52,1 \pm 48,6	3371,1 \pm 515,4	61,2 \pm 11,5	\emptyset	\emptyset	6,1 \pm 1,5
Strasser EF et al., 2005	15	Trima Accel 4.0	6,87 \pm 0,66	303 \pm 34 vs. 227 \pm 35	3820 \pm 530 ⁵⁾	75 \pm 14	\emptyset	68,8 \pm 6,8	5,59 \pm 0,74
	20		3,24 \pm 0,65	237 \pm 47 vs. 198 \pm 44	2480 \pm 450 ⁵⁾	53 \pm 12	\emptyset	60,8 \pm 13,4	3,85 \pm 1,25
Ringwald J et al., 2006*	20	Trima Accel 5.0	3,39 \pm 0,4	249 \pm 47,5 vs. 218 \pm 44,9	\emptyset	39 \pm 6	\emptyset	70,8 \pm 8,1	5,30 \pm 0,90
Fontana S et al., 2011	23	Trima Accel 5.1	5,2 \pm 0,7	244 \pm 34 vs. 159 \pm 19	3908 \pm 708	70 \pm 11	\emptyset	67 \pm 8	4,5 \pm 0,6
	23		7,7 \pm 0,5	267 \pm 31 vs. 160 \pm 17	5113 \pm 574	86 \pm 9	\emptyset	71 \pm 8	5,4 \pm 0,6
	22		10,0 \pm 1,1	305 \pm 44 vs. 172 \pm 31	5502 \pm 582	92 \pm 11	\emptyset	77 \pm 6	6,7 \pm 1,2

* simultane Gewinnung eines TKs und Plasmapräparates;

1) Blut/ AK-Verhältnis berücksichtigt;

2) Zeit ab der Insertion der Nadel, incl. Reinfusion und Blutprobenentnahme am Ende der Apherese;

3) ACD-Verbrauch berücksichtigt;

4) berücksichtigt AK-Menge im Produkt und die im Set verbliebene Menge an ACD (14 ml);

5) verarbeitetes Blutvolumen = prozessiertes Gesamtvolumen – ACD-Volumen;

In unserer Studie konnte ein Abfall der Thrombozytenkonzentration in der Tripel-Apherese-Gruppe von durchschnittlich 104/nl während der Apherese registriert werden. Dies entspricht einem prozentualen Abfall von 32,3 %. Im Gegensatz dazu fiel die Plättchenzahl in der Doppel-Apherese-Gruppe lediglich um 72/nl bzw. 26,9 %. Ein ähnlicher Thrombozytenkonzentrationsabfall von 81/nl bei der Doppel-Apherese-Spende konnte retrospektiv bei 674 Spendern evaluiert werden. Der untere Normwert von 150/nl wurde in der aktuellen Untersuchung von einem Spender in der Tripel-Apherese-Gruppe unterschritten. Dies entspricht bei einer Gesamtzahl von 79 durchgeführten Tripel-Apheresen einem Anteil von 1,3 %. Der Vergleich des Serum-Thrombopoetins vor und nach der Spende erbrachte in keiner der beiden Apherese-Gruppen messbare Unterschiede. Es konnten weder signifikante Veränderungen des Serum-TPO-Spiegels im Verlauf der sechs konsekutiven Spenden innerhalb der Apherese-Gruppen noch klare Abweichungen zwischen den beiden Gruppen erhoben werden. Der durchschnittlich ermittelte Serum-TPO-Spiegel vor den in der Studie durchgeführten Apheresen lag bei $37,5 \pm 29,3$ pg/ml und damit im Normbereich.

Die bisher zur Thrombozytapherese mit der Trima Accel publizierten Daten zeigten einen ähnlichen Thrombozytenkonzentrationsabfall im Spenderblut während der Apherese.

Moog et al. rekrutierten in ihrer Studie 426 Thrombozytenspender, die 2169 Thrombozytapheresen leisteten. Ein Großteil der Apheresen ($n = 1356$) wurde am Zellseparator Trima Accel durchgeführt. Die Spender durchliefen im Rahmen der Studie 1 – 12 Thrombozytapheresen. Alle Studienteilnehmer mussten ein Mindestgewicht von 80 kg und ein Plättchen-Vorwert von ≥ 280 /nl aufweisen. Die Apheresespender wurden randomisiert in einem Verhältnis von 1:1,2 in zwei Gruppen (Doppel-Apherese-Spender vs. Tripel-Apherese-Spender) aufgeteilt. Ein Vergleich der Vor- und Nachwerte der Plättchenkonzentration zeigte in der Doppel-Apherese-Gruppe einen durchschnittlichen Abfall von 26,4 % bzw. um 87/nl. Die Plättchenzahl der Spender, die ein Dreifach-TK leisteten, verringerte sich im Durchschnitt um 110/nl bzw. 33,0 %. Es wurden bei 2,3 % ($n = 24$) aller Tripel-Apheresen der untere Normwert der Thrombozytenkonzentration von 150/nl unterschritten. In der Gruppe, die ein Doppel-TK spendete, wurden lediglich 7 Fälle registriert, die eine Thrombozytenzahl von < 150 /nl nach der Spende aufwiesen. Die kleinste gemessene Thrombozytenkonzentration nach der Spende wurde mit 106/nl angegeben (Moog R et al., 2008).

In einer weiteren Studie von Moog sowie in der Studie von Fontana et al. lag der Rückgang der Thrombozytenkonzentration bei der Dreifach-TK-Spende mit 108/nl und 107/nl im Niveau unserer Studie. Bei keiner der durchgeführten Apheresen wurde die kritische Plättchenzahl von < 100 /nl unterschritten (Moog R, 2009; Fontana S et al., 2011).

Picker et al. konnten unter Verwendung der Trima Accel 5.0 bei der Dreifach-TK-Spende einen prozentualen Abfall der Plättchenkonzentration während der Spende von $31,7 \pm 7,3$ % nachweisen. Im Vergleich dazu fiel die Thrombozytenkonzentration bei der Doppel-TK-Spende im Durchschnitt um $30,0 \pm 6,7$ % ab (Picker SM et al., 2006b).

In weiteren Arbeiten wurden bei der Spende eines Doppel-TKs ähnliche Abfälle der Plättchenzahlen zwischen 52 – 85/nl registriert (Burgstaler EA et al., 2004; Flesch BK et al., 2010; Strasser EF et al., 2005; Fontana S et al., 2011).

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es bei regelmäßigen Thrombozytapherese-spenden zu signifikanten Veränderungen der Plättchenkonzentration beim Spender kommen kann. Richa et al. ermittelten bei 471 Spendern unter Verwendung der Trima Accel einen signifikanten Anstieg der Plättchenkonzentration über einen mittleren Spendezeitraum von 72 Wochen (Richa E et al., 2008). In anderen Arbeiten konnten bei Thrombozytenspendern sowohl konstante als auch rückläufige Thrombozytenkonzentrationen über einen Spendezeitraum festgestellt werden (Zantek ND et al., 2006; Quraishi N et al., 2006; Sanchez R et al., 2006; Katz L et al. 2007). Eine Korrelation zwischen einem Abfall der Plättchenkonzentration und der Anzahl gesammelter TKs oder der Spendefrequenz bei regelmäßigen Thrombozytenspenden konnte allerdings nicht gefunden werden (Vassallo RR et al., 2006b; Quraishi N et al., 2006; Sanchez R et al., 2006; Katz L et al. 2007).

In bereits publizierten Arbeiten bezüglich der Thrombopoetinkonzentration vor der Thrombozytapherese konnten annähernd gleiche bis deutlich höhere TPO-Vorwerte ermittelt werden. Die bei den Spendern gemessenen TPO-Spiegel lagen vor der Apherese im Durchschnitt bei 24 – 122 pg/ml (Kaiser F et al., 2008; Weisbach V et al., 1999; Dettke M et al., 1998; Tacke F et al., 1999). In anderen Arbeiten konnte, im Gegensatz zu unserer Studie, ein Anstieg der TPO-Konzentration nach der Apherese verzeichnet werden. Die publizierten Daten zeigten eine Zunahme des nach der Apherese gemessenen TPOs zwischen 8,3 – 69,6 % (Kaiser F et al., 2008; Weisbach V et al., 1999; Dettke M et al., 1998).

Ein ähnliches Design wie die hiesige Studie hatte die von Kaiser und Kollegen durchgeführte Studie. Sie untersuchten den Einfluss der Tripel-Apherese auf hämatopoetische Wachstumsfaktoren (TPO, EPO, HGF, Flt3-Ligand, IL-11, IL-6, IL-3, SCF). Ein Spenderkollektiv von 32 Thrombozytenspendern wurde auf zwei Gruppen aufgeteilt, die jeweils vier konsekutive Tripel-Apheresen in einem Intervall von 15 Tagen oder in einem Intervall von 22 Tagen durchliefen. Kaiser et al. untersuchten u.a. die Entwicklung des TPO-Spiegels vor und direkt nach der Spende bei der ersten und vierten konsekutiven Spende. Es konnten weder signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (15 Tage vs. 22 Tage) noch signifikante

Veränderungen des TPO-Spiegels zwischen der ersten und vierten konsekutiven Tripel-Apherese gefunden werden. Der bei der ersten (prä-TPO: 24 ± 6 pg/ml; post-TPO: 26 ± 6 pg/ml; $p = 0,05$) und vierten Spende (prä-TPO: 24 ± 5 pg/ml; post-TPO: 26 ± 6 pg/ml; $p = 0,009$) gemessene TPO-Spiegel stieg geringfügig an. In unserer Studie konnten im Durchschnitt etwas höhere TPO-Vorwerte nachgewiesen werden. Dennoch untermauern die Daten von Kaiser et al. unsere Ergebnisse, da auch wir keine Veränderungen des Serum-Thrombopoetins bei den sechs konsekutiven Apheresen beobachten konnten (Kaiser F et al., 2008).

Weisbach et al. untersuchten den Verlauf verschiedener Wachstumsfaktoren (TPO, EPO, IL-1 β , SCF) bei 21 Thrombozytenspendern vor, während und nach der Thrombozytapherese sowie ein, zwei und sieben Tage nach der Apherese. Der Plättchenertrag betrug durchschnittlich $4,7 \pm 0,5 [\times 10^{11}]$. Die vor der Apherese gemessene TPO-Konzentration ergab im Durchschnitt $49,5 \pm 25,5$ pg/ml. Zwischen den am Ende der Apherese und den am nächsten Tag ($56,9 \pm 26,7$ pg/ml) gemessenen TPO-Konzentrationen zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p = 0,01$) (Weisbach V et al., 1999).

In der Arbeit von Dettke et al. wurden 23 gesunde Thrombozytenspender rekrutiert, die alle ein Einfach-TK leisteten. Der Serumspiegel des TPOs wurde vor und nach der Spende und an den folgenden vier Tagen bestimmt. Die vor der Apherese gemessene mittlere TPO-Konzentration von $69,2 \pm 7,1$ pg/ml stieg auf $117 \pm 6,8$ pg/ml am zweiten Tag nach der Spende an. Obwohl die im Durchschnitt gesammelte Plättchenzahl mit $3,8 \pm 1,2 [\times 10^{11}]$ etwas niedriger als bei Weisbach et al. ausfiel, konnte ein stärkerer Anstieg des TPOs am Ende des Aphereseverfahrens gezeigt werden (69,6 % vs. 25,5 %). In beiden Studien wurde der identische TPO-ELISA verwendet (Dettke M et al., 1998).

Schöffski und Kollegen publizierten, dass der TPO-Spiegel bei Thrombozytapheresespendern weder von der Spendefrequenz noch von der Anzahl der gespendeten Blutplättchen in den letzten sechs Monaten oder dem individuellen Spendeabstand abhängig ist (Schöffski P et al., 1999).

Durch die Verwendung verschiedener Softwareversionen, eine unterschiedliche Spenderpopulation mit verschiedenen hämatologischen und anthropometrischen Vorwerten und die differierenden Plättchenerträge, ist eine Bewertung der hämatologischen Laborparameter im Vergleich mit anderen publizierten Arbeiten nur eingeschränkt möglich. Um die bisher publizierten Studien bezüglich einer signifikanten Zunahme des Serum-Thrombopoetins kurze Zeit nach einer erfolgten Thrombozytenspende zu untermauern, könnten in nachfolgenden Untersuchungen zusätzliche Messungen des Serum-Thrombopoetins in einem engen zeitlichen Abstand nach der erfolgten Thrombozytapherese durchgeführt werden.

5.1.2 Verfahrensdaten

5.1.2.1 Verfahrenszeit und verarbeitetes Blutvolumen

Die Verfahrenszeit zur Gewinnung einer bestimmten Anzahl an Thrombozytenkonzentraten sollte für den Spender in einem akzeptablen Rahmen liegen. Bei der Thrombozytapheresespende im Blutspendedienst des Universitätsklinikums des Saarlandes sollte eine Verfahrenszeit von 90 min nicht überschritten werden. Es ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit erhobene Verfahrenszeit lediglich die Zeit von Beginn der Separation bis zum Erhalt des gewünschten Produkts darstellt. Die Vorbereitungszeit, die Blutrückführung am Ende der Apherese und die Zeit, bis das Produkt zur Einlagerung bereit lag, blieben in der dokumentierten Verfahrenszeit unberücksichtigt. Daraus ergeben sich in der Literatur unter Umständen abweichende Angaben der Verfahrenszeit. Die erhobenen Verfahrensparameter (Verfahrenszeit, verarbeitetes Blutvolumen, ACD-Verbrauch, ACD-Infusionsrate) sind u.a. abhängig von dem Geschlecht des Apheresespenders, dem Plättchen-Vorwert, dem Hämatokrit und den vorgenommenen Geräteeinstellungen. Das vom Zellseparator verarbeitete Blutvolumen wurde bei unserer Studie durch Ablesen am Ende der Thrombozytapherese aus der Verfahrenszusammenfassung der Trima Accel evaluiert.

Im Rahmen der Studie betrug das durchschnittlich verarbeitete Blutvolumen zur Sammlung von im Durchschnitt $8,2 [\times 10^{11}]$ Blutplättchen bei den 79 durchgeführten Tripel-Apheresen 4283 ml. Die dafür benötigte Verfahrenszeit lag im Mittel bei 76,5 min. Die Gruppe, die lediglich ein Doppel-TK spendete, wies eine durchschnittliche Verfahrenszeit von 60,9 min auf. Das in dieser Zeit verarbeitete Blutvolumen wurde im Durchschnitt mit 3216 ml ermittelt.

Picker et al. konnten bei der Durchführung von vier Tripel-Apheresen eine mit der hiesigen Studie identische Verfahrenszeit von durchschnittlich 77 min ermitteln. Beachtet man jedoch, dass bei der Ermittlung sowohl die Reinfusionszeit als auch die Zeit nach der Apherese zur Blutprobenentnahme berücksichtigt wurde, war die reine Separationszeit geringer als in unserer Studie. Ein Grund könnte in der ausgewählten Spenderpopulation liegen. Im Durchschnitt hatten die Studienteilnehmer ein im Vergleich zu unserer Studie größeres Gesamtblutvolumen (5,7 l) und etwas höhere Plättchen-Vorwerte (320/nl) (Picker SM et al., 2006b). Bei der Studie von Moog konnte eine um durchschnittlich 9 min längere Verfahrenszeit zur Gewinnung eines Dreifach-TKs beobachtet werden, bei Fontana et al. wurde eine vergleichbare Verfahrenszeit gemessen (Moog R, 2009; Fontana S et al., 2006). In einer weiteren Arbeit von Fontana et al. betrug die durchschnittliche Verfahrenszeit zur Gewinnung eines Dreifach-

TKs 86 min und lag damit knapp 10 min über der in unserer Studie (Fontana S et al., 2011). Weitere Publikationen zur Verfahrenszeit bei Tripel-Apheresen mit der Trima Accel liegen momentan nicht vor.

In anderen Arbeiten wurden ähnliche bis leicht höhere Verfahrenszeiten zur Herstellung von Doppel-TKs nachgewiesen (Picker SM et al., 2006b; Burgstaler EA et al., 2004; Flesch BK et al., 2010; Fontana S et al., 2011).

In der von Picker und Kollegen publizierten Arbeit wurde ein durchschnittlich verarbeitetes Blutvolumen von 4406 ml für die Herstellung eines Dreifach-TKs ermittelt. Bei der Angabe des prozessierten Blutvolumens wurde von den Autoren das Blut/ AK-Verhältnis berücksichtigt (Picker SM et al., 2006b). Das in unserer Studie verarbeitete Blutvolumen lag mit 4283 ml annähernd auf gleichem Niveau. Ein höheres prozessiertes Blutvolumen wurde von Moog evaluiert. Das verarbeitete Blutvolumen betrug durchschnittlich 4900 ml (Moog R, 2009). Ein ähnliches verarbeitetes Blutvolumen wie in der hiesigen Arbeit konnte in der Studie von Fontana et al. nachgewiesen werden. Bei einem durchschnittlichen Plättchenertrag von 7,5 [$\times 10^{11}$] betrug das verarbeitete Blutvolumen in dieser Studie im Mittel 4331 ml (Fontana S et al., 2006). In einer weiteren Studie konnten Fontana et al. bei der Herstellung von Dreifach-TKs ein deutlich höheres verarbeitetes Blutvolumen evaluieren. Das prozessierte Blutvolumen betrug durchschnittlich 5113 ml. Die Diskrepanz im Vergleich zu unserer Studie lässt sich durch eine deutlich niedrigere Thrombozytenkonzentration der Spender vor Beginn der Apherese erklären (Fontana S et al., 2011).

Bei einem Vergleich mit anderen publizierten Daten zur Spende eines Doppel-TKs findet man vergleichbare bis leicht höhere prozessierte Blutvolumina (Picker SM et al., 2006b; Flesch BK et al., 2010; Fontana S et al., 2011). Die in den Arbeiten von Burgstaler et al. und Strasser et al. ermittelten größeren prozessierten Blutvolumina können durch einen im Durchschnitt höheren erzielten Plättchenertrag erklärt werden (Burgstaler EA et al., 2004; Strasser EF et al., 2005).

5.1.2.2 ACD-Verbrauch und ACD-Infusionsrate

Der ACD-Verbrauch und die ACD-Infusionsrate stellen wichtige Parameter bezüglich der Spendersicherheit dar. Durch die ACD-Infusionsrate kann das Risiko für citratspezifische Nebenwirkungen beim Apheresespender abgeschätzt werden, da es bei höheren ACD-Infusions-

raten zum vermehrten Auftreten von Citratreaktionen beim Spender kommen kann. Bei einer Thrombozytapherese erhält der Spender bis zu 10 g Citrat (Strauss RG, 1996).

Durch unterschiedliche Spenderkollektive und Plättchenerträge sowie differierende Geräteeinstellungen sind Vergleiche des ACD-Verbrauchs und der ACD-Infusionsrate zwischen verschiedenen Studien nur eingeschränkt möglich.

In der Studie von Picker et al. wurde eine durchschnittlich infundierte ACD-Menge von 383 ml bei der Gewinnung von Dreifach-TKs angegeben. Bei der Berechnung wurde das im Präparat enthaltene Citrat von dem im Display angezeigten ACD-Verbrauch subtrahiert. Die Bestimmung der Citratmenge im Produkt erfolgte photometrisch (Picker SM et al., 2006b). Eine ähnliche infundierte ACD-Menge mit 359 ml wurde in der von uns durchgeführten Studie aus der Verfahrenszusammenfassung dokumentiert. Der von Fontana und Kollegen gezeigte mittlere ACD-Gesamtverbrauch von 469 ml lag auf gleichem Niveau wie in unserer Studie (Fontana S et al., 2006). Fontana et al. konnten in einer weiteren Arbeit bei der Gewinnung von Dreifach-TKs einen durchschnittlichen ACD-Gesamtverbrauch von 508 ml und eine infundierte ACD-Menge von 427 ml nachweisen (Fontana S et al., 2011).

Die ACD-Infusionsrate der Dreifach-TK-Spende bei Picker et al. wurde mit 0,95 ml/min/l evaluiert (Picker SM et al., 2006b). Die in unserer Studie gemessene ACD-Infusionsrate lag mit 0,87 ml/min/l im vergleichbaren Bereich. Bei der Berechnung der ACD-Infusionsrate in unserer Studie wurde lediglich die von der Trima Accel angegebene AK-Menge an den Spender berücksichtigt, sodass daraus die etwas niedrigere ACD-Infusionsrate resultieren könnte. Zurzeit liegen keine weiteren Publikationen zu ACD-Infusionsraten bei Tripel-Apherese-Spenden vor. Die Literaturangaben bezüglich der ACD-Infusionsrate bei der Herstellung von Einfach- und Doppel-TKs schwanken in einem Bereich von 0,73 – 1,09 ml/min/l (Picker SM et al., 2006b; Ringwald J et al., 2003; Bueno JL et al., 2005).

5.1.2.3 Citratspezifische Nebenwirkungen

Durch Thrombozytapheresen können beim Spender verschiedene Nebenwirkungen auftreten. Während der Apherese wird dem Spender antikoaguliertes Blut retransfundiert. Das darin enthaltene ACD ist in der Lage Calciumionen zu binden, sodass es beim Thrombozytenspender zur sekundären Hypokalzämie kommen kann. In der Arbeit von Bolan et al. konnte ein durchschnittlicher Abfall des ionisierten Calciums bei Thrombozytapheresen von 33 % festgestellt werden (Bolan CD et al., 2001).

Bei den Tripel-Apheresen traten in unserer Studie in rund 80 % der Fälle keine citratspezifischen Nebenwirkungen (Grad 0) auf. Lediglich 15,2 % der Tripel-Apheresen (n = 12) wurden mit Grad 1, 3,8 % der Apheresen (n = 3) mit Grad 2 und eine Apherese mit Grad 3 nach Bueno et al. klassifiziert (Bueno JL et al., 2005).

In verschiedenen Publikationen konnten sowohl annähernd gleiche als auch niedrigere Inzidenzen citratspezifischer Nebenwirkungen gefunden werden. In der Studie von Moog et al. zeigten sich in 10,5 % aller Apheresen unerwünschte Reaktionen. Bei den Tripel-Apheresen wurde eine höhere Inzidenz citratspezifischer Nebenwirkungen nachgewiesen als bei den Doppel-Apheresen (n = 13 vs. n = 7). Bei einem Spender, der ein Dreifach-TK spenden sollte, musste die Apherese aufgrund von citratspezifischen Nebenwirkungen abgebrochen werden (Moog R et al., 2008). Moog stellte in einer weiteren Studie bei lediglich 21 Tripel-Apheresen bzw. 4,4 % Nebenwirkungen fest (u.a. zirkulatorische Reaktionen, Hämatome, citratspezifische Nebenwirkungen). Eine Erklärung für diese relativ niedrige Rate an Komplikationen könnte in der Spenderauswahl (zwei Drittel der Apheresespender waren männlichen Geschlechts) sowie in der prophylaktischen Gabe einer 500 mg Calciumtablette vor jeder Apherese liegen (Moog R, 2009). Makar et al. berichteten unter Verwendung verschiedener Zellseparatoren bei 11,7 % aller Thrombozytapheresen (n = 13.070) von citratspezifischen Nebenwirkungen. Mithilfe einer Toxizitätsskala, ähnlich wie die in unserer Studie, wurde die Verteilung der citratspezifischen Nebenwirkungen erfasst (Grad 1: 8,58 %; Grad 2: 2,56 %; Grad 3: 0,27 %; Grad 4: 0,24 %; Grad 5: 0,03 %). In anderen Arbeiten wurde die Inzidenz von Citratreaktionen mit lediglich 0,3 – 1,2 % angegeben. Dabei ist zu beachten, dass in manchen Protokollen die prophylaktische Einnahme von Calciumtabletten empfohlen wurde, sodass unterschiedliche Inzidenzen u.a. dadurch zu erklären sind (Makar YF et al., 2002; McLeod BC et al., 1998; Despotis GJ et al., 1999). Unter Verwendung des Zellseparators Trima Accel 5.1 wurden in der Studie von Yuan et al. bei 15.000 Thrombozyt-, Plasma- und Erythrozytapheresen eine Komplikationsrate von moderaten und schweren Nebenwirkungen bei 0,4 % der Apheresen registriert. Dabei traten citratspezifische Reaktionen überwiegend bei Frauen, älteren Spendern und Spendern mit einem niedrigen Gesamtblutvolumen auf. Die Apheresespender wurden angehalten, ihren Calciumspiegel durch entsprechende Maßnahmen, wie beispielsweise das Einnehmen von Calciumtabletten am Tag vorher, zu erhöhen. Zudem sollten die Spender als Prophylaxe vor Beginn der Apherese Calciumtabletten zu sich nehmen (Yuan S et al., 2010). Die Inzidenz von moderaten und schweren Reaktionen bei über 90.000 Thrombozytapheresen wurde von Wiltbank et al. mit 0,2 % angegeben (Wiltbank TB et al., 2007). In der Multicenterstudie von McLeod und Kollegen wurde der prozentuale Anteil an

akuten Reaktionen bei Aphereseverfahren auf 2,2 % beziffert. Dabei hatten die Citratreaktionen einen Anteil von 0,4 %. Außerdem konnten Hämatome, Schmerzen und vasovagale Reaktionen evaluiert werden. Sowohl McLeod et al. als auch Despotis et al. wiesen auf die unterschiedliche Inzidenz von akuten Reaktionen unter Verwendung verschiedener Zellseparatoren hin (McLeod BC et al., 1998; Despotis GJ et al., 1999). In der Studie von Fontana et al. wurden die Spender nach erfolgter Thrombozytapherese mit der Trima Accel aktiv nach dem Auftreten von Nebenwirkungen befragt. Die Nebenwirkungsrate betrug bei der Dreifach-TK-Spende 57 %. Jedoch zeigte sich keine signifikante Zunahme der Nebenwirkungsrate mit steigender Anzahl gespendeter therapeutischer Einheiten (Doppel-TK, Dreifach-TK, Vierfach-TK) und die Verträglichkeit des Verfahrens wurde von den Spendern mit „sehr gut“ evaluiert (Fontana S et al., 2011).

Durch die prophylaktische orale Calciumapplikation lassen sich in manchen Arbeiten die unterschiedlichen Inzidenzen bezüglich dem Auftreten von citratspezifischen Nebenwirkungen erklären. Außerdem ist die Art der Evaluierung von Citratreaktionen entscheidend. In einigen Einrichtungen werden die Spender aktiv nach dem Auftreten von Citratreaktionen nach der Thrombozytapherese befragt. In anderen Spendediensten werden Citratreaktionen lediglich dokumentiert, nachdem der Apheresespender davon berichtet hat. Makar et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass durch aktives Nachfragen nach Thrombozytapheresen bezüglich des Auftretens von citratspezifischen Nebenwirkungen eine um bis zu 25-fach höhere Inzidenz evaluiert werden kann (Makar YF et al., 2002). Durch eine fehlende Standardisierung der Citratreaktionen und durch die Verwendung verschiedener Zellseparatoren, Geräteeinstellungen und Softwareversionen ist eine Interpretation unterschiedlicher Literaturangaben wieder nur eingeschränkt möglich.

In unserer Studie konnte eine niedrige Inzidenz von Citratreaktionen bei der Spende eines Dreifach-TKs gezeigt werden, obgleich die Spender nach der Apherese aktiv befragt wurden. Somit spricht die derzeitige Datenlage, unter Beachtung bestimmter Mindeststandards, für eine sichere Durchführung von Tripel-Apheresen mit dem Trima Accel-Sammelsystem.

5.1.2.4 Sammlungsrate und Sammlungseffizienz

Durch die Berechnung der Sammlungsrate und der Sammlungseffizienz der Blutplättchen lassen sich Aphereseverfahren verschiedener Publikationen miteinander vergleichen.

Picker et al. berechneten unter Zellseparation mit der Trima Accel 5.0 eine Sammlungsrate der Blutplättchen von $6,7 [\times 10^{11}/h]$ für die Herstellung von Dreifach-TKs (Picker SM et al., 2006b). Diese stimmte ziemlich genau mit der von uns ermittelten Sammlungsrate von $6,5 [\times 10^{11}/h]$ überein. Fontana et al. wiesen mit der Trima Accel 5.1 eine geringere durchschnittliche Sammlungsrate bei der Spende eines Dreifach-TKs von $5,4 [\times 10^{11}/h]$ nach (Fontana S et al., 2011). Weitere publizierte Sammlungsraten für die Herstellung von Dreifach-TKs liegen zurzeit nicht vor. Für die Herstellung von Einfach- und Doppel-TKs konnten in weiteren Arbeiten geringere Sammlungsraten von $3,9 - 6,4 [\times 10^{11}/h]$ gezeigt werden (Picker SM et al., 2006b; Burgstaler EA et al., 2004; Ringwald J et al., 2003; Bueno JL et al., 2005; Flesch BK et al., 2010; Strasser EF et al., 2005; Ringwald J et al., 2006; Fontana S et al., 2011).

Die von Picker et al. nachgewiesene hohe Sammlungseffizienz zur Gewinnung von Dreifach-TKs von 72,4 % konnte durch eine von uns ermittelte identische Sammlungseffizienz untermauert werden (Picker SM et al., 2006b). Auch Fontana et al. konnten bei der Dreifach-TK-Spende eine hohe Sammlungseffizienz von 71 % nachweisen (Fontana S et al., 2011). Weitere Literaturangaben bezüglich der Sammlungseffizienz der Trima Accel wurden bisher lediglich für die Gewinnung von Einfach-TKs und Doppel-TKs publiziert. Die Sammlungseffizienzen wiesen sowohl annähernd gleiche als auch etwas niedrigere Werte als in der hiesigen Studie auf (Picker SM et al., 2006b; Burgstaler EA et al., 2004; Ringwald J et al., 2003; Bueno JL et al., 2005; Strasser EF et al., 2005; Ringwald J et al., 2006; Fontana S et al., 2011). Die etwas niedrigeren Sammlungseffizienzen könnten auf die verwendeten älteren Softwareversionen, die unterschiedlichen Spenderpopulationen und auf abweichende Geräteeinstellungen zurückzuführen sein.

5.1.2.5 Gerätegenauigkeit

Zurzeit liegen nur wenige publizierte Arbeiten zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel vor. Es wurden bisher keine Daten zur Gerätegenauigkeit bei der Herstellung von Dreifach-TKs veröffentlicht.

In der hiesigen Studie konnte bei 97,5 % aller Tripel-Apheresen eine Unterschätzung des hergestellten TK-Volumens um durchschnittlich 13,1 ml gezeigt werden. Der gemessene PLT-Ertrag lag im Durchschnitt mit $8,2 [\times 10^{11}]$ knapp über dem Plättchenzielertrag von $8,0 [\times 10^{11}]$. Bei 58,2 % aller Tripel-Apheresen ermittelte die Gerätesoftware eine zu geringe kalkulierte Verfahrenszeit.

In der Studie von Bueno et al. wurden Angaben zur Gerätegenauigkeit der Trima Accel mit der Softwareversion 5.0 gemacht. Dabei wurden das hergestellte TK-Volumen und der Plättchenertrag von dem Trima Accel-System überschätzt. Die Verfahrenszeit hingegen wurde unterschätzt. Die chronometrisch ermittelte Verfahrenszeit war durchschnittlich 5,8 min länger als die am Ende der Apherese in der Verfahrenszusammenfassung aufgelistete Verfahrenszeit (Bueno JL et al., 2005). In unserer Studie wurde lediglich die von der Trima Accel am Anfang der Apherese kalkulierte Verfahrenszeit mit der am Ende der Apherese in der Verfahrenszusammenfassung angezeigten tatsächlichen Verfahrenszeit verglichen. Bezüglich der Gerätegenauigkeit der Trima Accel 5.0 konnten Fontana et al. eine Unterschätzung des hergestellten Plättchenertrages aufzeigen. Der kalkulierte Zielertrag betrug durchschnittlich $6,8 [\times 10^{11}]$, der tatsächlich gemessene Plättchenertrag $7,5 [\times 10^{11}]$ (Fontana S et al., 2006). Durch verschiedene Einstellungen der Gerätekonfiguration der Trima Accel lassen sich die erzielten Plättchenerträge in den einzelnen Blutspendezentren aber nur unter Vorbehalt vergleichen.

5.1.3 Spenderkomfort

Ein wichtiges Kriterium bei der Thrombozytapherese stellt der Spenderkomfort dar. In der durchgeführten Studie wurden das allgemeine Wohlbefinden, der Entnahmefluss sowie der Rückfluss von den Tripel-Apherese-Spendern mit „ausgezeichnet“ und „gut“ evaluiert. Die Verträglichkeit des Verfahrens, die Spende im Einarm-Verfahren und eine angenehme Flussgeschwindigkeit wurden von den Studienteilnehmern größtenteils mit „wichtig“ bzw. „sehr wichtig“ beurteilt. Bezüglich der Dauer des Spendeverfahrens zeigte sich keine einheitliche Tendenz. Die kurze Dauer des Spendeverfahrens wurde jeweils von vier Tripel-Apherese-Spendern mit „wichtig“ bzw. „unwichtig“ bewertet.

In der publizierten Arbeit von Fontana et al. wurden die Fragen zum allgemeinen Wohlbefinden und zur Toleranz des Entnahme- und Rückflusses bei der Thrombozytenspende unter Verwendung der Trima Accel ebenfalls mit „gut“ und „ausgezeichnet“ bewertet. Die kurze Dauer des Spendeverfahrens sowie eine gute Toleranz der Flussraten und die citratspezifischen Nebenwirkungen wurden von dem Großteil der Studienteilnehmer als wichtige Parameter eingestuft (Fontana S et al., 2006). In einer weiteren Studie von Fontana et al. zeigten die Spender nach erfolgter Thrombozytapherese mit der Trima Accel, unabhängig von der Anzahl gespendeter therapeutischer Einheiten (Doppel-TK, Dreifach-TK, Vierfach-TK), eine durchweg sehr hohe Zufriedenheit mit dem Verfahren (Fontana S et al., 2011). Für 55 % der

Aphereseteilnehmer von Bueno et al. spielte die Schnelligkeit des Verfahrens die größte Rolle bei der Auswahl des von dem Spender gewünschten Zellseparators (Bueno JL et al., 2005). In unserer Studie zeigte sich durchweg eine hohe Spenderzufriedenheit und Akzeptanz bei der Gewinnung von Dreifach-TKs mit der Trima Accel.

5.1.4 Operatorenkomfort

Die an der Studie beteiligten Operatoren bekamen am Ende der Studie einen standardisierten Fragebogen bezüglich der Zufriedenheit mit dem Trima Accel-Sammelsystem. Dabei zeigten sich in den Kriterien Auf- und Abrüsten des Gerätes, Durchführung des Sammelverfahrens, Bearbeitung von Fehlermeldungen und Menüführung durchweg zufrieden stellende Bewertungen.

Publikationen, die die aufgelisteten Kriterien zur Beurteilung des Zellseparators Trima Accel durch Operatoren berücksichtigen, liegen nicht vor. In zwei publizierten Arbeiten wurden auftretende technische Probleme während des Aphereseverfahrens mit der Trima Accel erfasst. Bei Fontana et al. wurden bei 21 von 59 Apheresen geringfügige technische Probleme evaluiert, wovon die meisten aufgrund von Problemen mit der Blutflussrate bedingt waren. In unserer Studie traten ebenfalls die meisten Probleme bedingt durch die Blutflussraten auf, obgleich eine quantitative Evaluierung ausblieb. In einer weiteren Arbeit von Bueno und Kollegen wurde die Interventionsrate durch das Personal auf 25 % der mit der Trima Accel durchgeführten Apheresen beziffert (Fontana S et al., 2006; Bueno JL et al., 2005).

Die bei der Doppel- und Tripel-Apherese mit der Trima Accel auftretenden technischen Probleme könnten in nachfolgenden Studien quantitativ erfasst werden, um so mögliche Differenzen zwischen den beiden Apheresearten aufzuzeigen.

5.2 Qualitätskontrolle

Bisher liegt lediglich eine Publikation von Picker und Kollegen vor, die sich ebenfalls mit Qualitätskontrollen an Dreifach-TKs, die mit der Trima Accel 5.1 hergestellt wurden, beschäftigten (Picker SM et al., 2009).

Ein Vergleich der Ergebnisse unserer Studie mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die für die Apherese andere Zellseparatoren verwendet haben, ist nur unter Vorbehalt möglich.

Wie in einigen Arbeiten gezeigt werden konnte, können unterschiedliche Thrombozytapheresesysteme differierende Aktivierungsraten der Blutplättchen zur Folge haben (Skrupchenko A et al., 2008; Hagberg IA et al., 2000; Jilma-Stohlawetz P et al., 2009; Macher S et al., 2010).

Eine weitere Problematik besteht in der fehlenden Standardisierung der Thrombozytenfunktionstests und in der Tatsache, dass die Messungen zur Thrombozytenqualität je nach Arbeitsgruppe an unterschiedlichen Lagerungstagen evaluiert wurden, sodass Vergleiche zwischen einzelnen Publikationen nur schwer möglich sind.

Die in unserer Studie untersuchten Thrombozytenpräparate (n = 40) erfüllten allesamt die nach den Richtlinien der BÄK geforderten Prüfkriterien.

5.2.1 Thrombozytenkonzentration und mittleres Plättchenvolumen

In der hiesigen Studie konnte eine geringfügige Abnahme der Plättchenkonzentration im Thrombozytenpräparat während der gesamten Lagerungszeit aufgezeigt werden. Das MPV blieb von Tag 1 bis auf Tag 5 annähernd auf gleichem Niveau ($p = 0,272$), während von Tag 5 auf Tag 7 und während der gesamten Lagerungszeit von Tag 1 auf Tag 7 eine signifikante Zunahme des MPVs beobachtet werden konnte.

Unter Verwendung des Zellseparators Trima Accel 5.0 konnten von Albanyan et al., die auch an Tag 1, Tag 5 und Tag 7 Qualitätskontrollen durchführten, ebenfalls eine signifikante Zunahme der mittleren Plättchenvolumina während der Lagerung gezeigt werden. Im Unterschied zu unserer Studie zeigte sich bereits von Tag 1 auf Tag 5 eine signifikante Zunahme des MPVs ab. Ähnlich wie in unserer Studie konnte eine signifikante Abnahme der Plättchenkonzentration vom Herstellungstag bis zu Tag 7 der Lagerung offenbart werden (Albanyan AM et al., 2009). In der Studie von Wagner et al., die das Trima Accel-Sammelsystem 5.1 verwendeten, konnte eine Zunahme des MPVs vom Tag der Herstellung bis zu Tag 5 der Lagerung registriert werden (Wagner SJ et al., 2008). In den Arbeiten von Tynngård et al. zeigten sich einen Tag nach der Herstellung signifikant niedrigere mittlere Plättchenvolumina, während der weiteren Lagerungszeit wiesen die Thrombozyten gleich bleibende Volumina auf (Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b). In einer weiteren Arbeit von Dumont und Kollegen konnten während der Lagerung ebenfalls konstante mittlere Plättchenvolumina nachgewiesen werden (Dumont LJ et al., 2002). In einer Vielzahl von Publikationen zeigten sich sowohl unter Zellseparation mit der Trima Accel als auch bei der Verwendung anderer Zellseparatoren (COBE Spectra, Fenwal AS 104) während der Lagerung konstante

Thrombozytenkonzentrationen (Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b; Picker SM et al., 2009; Dumont LJ et al., 2003; Böck M et al., 2002; Dumont LJ et al., 2002).

5.2.2 Swirling und pH-Wert

Ein Fehlen des Swirling-Phänomens geht mit einem geringeren Inkrement und einem höheren Risiko für Transfusionsreaktionen einher (Brecher ME et al., 2004). Das Swirling-Phänomen korreliert hochsignifikant mit dem pH-Wert des TKs (Wagner SJ et al., 1996). Der pH-Wert hat in bestimmten Bereichen einen negativen Einfluss auf das Swirling-Phänomen. In der Studie von Bertolini et al. war der pH-Wert bei 69 % der TKs, die kein Swirling-Phänomen zeigten, $< 6,4$ oder $> 7,6$ (Bertolini F et al., 1996).

Während der Lagerung eines Thrombozytenpräparates kommt es durch die Produktion von Laktat in der Glykolyse zu einer pH-Wert-Erniedrigung. Nach den Richtlinien der BÄK müssen die untersuchten TKs am Ende der Haltbarkeit in einem pH-Bereich zwischen 6,4 – 7,8 liegen, wobei 90 % der Präparate einen pH-Wert zwischen 6,5 – 7,6 aufweisen müssen (Richtlinien BÄK, 2010). In den ersten 24 – 48 h verliert der Lagerungsbeutel CO_2 , bis die Verlustrate über den Beutel sich der metabolischen Produktionsrate annähert und somit der pH-Wert anfängt abzufallen (Dumont LJ et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass bei einem $\text{pH} < 6,0 - 6,2$ die in vivo Überlebensrate der Thrombozyten stark vermindert ist (Holme S, 1998; Stuart MJ et al., 1972). Bezüglich einer Erhöhung des pH-Wertes und der Wiederfindungsrate liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Während Murphy bei einer Erhöhung des pH-Wertes über 7,2 eine geringere „recovery“ fand, zeigten Dumont und Kollegen, dass TKs mit einem pH von 7,6 vernünftige Recoveryraten in vivo aufwiesen (Murphy S et al., 1975; Dumont LJ et al., 2002). Mögliche bakterielle Kontaminationen, metabolische Veränderungen und der Restleukozytengehalt im TK sind in der Lage, den pH-Wert zu verändern (Holme S, 1998; Burstain JM et al., 1997; Barker LM et al., 2010).

In unserer Studie wurde gezeigt, dass das Swirling-Phänomen mit zunehmender Lagerungsdauer signifikant abnahm. Bei allen Produkten konnte während der gesamten Lagerungszeit ein „swirling effect“ nachgewiesen werden. Insgesamt stieg der pH-Wert während der Lagerung an. Der pH-Wert offenbarte vom Tag der Herstellung bis zu Tag 5 einen signifikanten Anstieg, während der pH-Wert von Tag 5 auf Tag 7 signifikant abfiel. Alle untersuchten TKs erfüllten sowohl an Tag 5 als auch an Tag 7 den von den Richtlinien der BÄK geforderten pH-Wert.

Das Swirling-Phänomen wurde in den Studien von Tynngård und Kollegen bei allen TKs, die mit der Trima Accel hergestellt wurden, während der Lagerung mit Grad 3 (exzellent) bewertet (Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b). In der Arbeit von Wagner et al. wurde, ähnlich wie in unserer Studie, eine geringfügige Abnahme des Swirling-Phänomens über die siebentägige Lagerungszeit beobachtet (Wagner SJ et al., 2008). Ein Nachweis des „swirling effects“ während der gesamten Lagerungszeit konnte in weiteren Arbeiten nachgewiesen werden (Macher S et al., 2010; Curvers J et al., 2004).

Ähnlich wie in unserer Studie konnte in anderen Arbeiten ein vorübergehender frühzeitiger Anstieg des pH-Wertes mit einem nachfolgenden Abfall während der Lagerung der TKs, die u.a. mit der Trima Accel hergestellt wurden, gezeigt werden (Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b; Dumont LJ et al., 2003; Zimmermann R et al., 2001; Macher S et al., 2010). In weiteren Arbeitsgruppen konnten unter Verwendung der Trima Accel und anderer Zellseparatoren während der Lagerung eine Erniedrigung des pH-Wertes evaluiert werden (Wagner SJ et al., 2008; Dumont LJ et al., 2002). Bezüglich des pH-Wertes von TKs, die mit der Trima Accel 5.0 hergestellt wurden, konnten Albanyan et al. keine signifikanten Veränderungen von Tag 1 über Tag 5 auf Tag 7 zeigen (Albanyan AM et al., 2009).

Letztendlich konnten unsere Ergebnisse bezüglich des Swirling-Phänomens und pH-Wertes durch andere Publikationen untermauert werden.

5.2.3 Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenase

In den Blutplättchen wird Glukose mithilfe der Glykolyse zu Laktat und Hydrogenionen umgesetzt. Die Hydrogenionen werden durch die im TK befindlichen Bicarbonationen abgepuffert. Die Pufferkapazität wird bei einer Laktatkonzentration von etwa 20 mmol/l erschöpft, so dass der pH-Wert ab dieser Konzentration stark abfällt (Cardigan R et al., 2005). Dies hat zur Folge, dass ein kontinuierlicher Glukoseverbrauch sowie eine Laktatproduktion während der Lagerung stattfinden. Eine Erniedrigung der Glukosekonzentration sowie eine Erhöhung der Laktatkonzentration über 28 mmol/l sind mit einem pH-Abfall und einem Verlust der Funktionsfähigkeit der Thrombozyten verbunden (Gulliksson H, 2003; Tynngård N et al., 2008a). Durch den Plättchenlagerungsschaden kommt es mit zunehmender Lagerung eines Thrombozytenpräparates zum Anstieg des normalerweise intrazytoplasmatisch befindlichen Enzyms Laktatdehydrogenase (Tynngård N et al., 2008a).

In der durchgeführten Studie konnte ein signifikanter Anstieg der Laktatkonzentration vom Tag der Herstellung über Tag 5 auf Tag 7 der Lagerung nachgewiesen werden. Alle gemessenen Laktatkonzentrationen lagen unterhalb der Pufferkapazität von 20 mmol/l. Die LDH-Aktivität stieg ebenfalls über alle Messpunkte signifikant an. Der Glukoseverbrauch zeigte sich in einer signifikanten Abnahme der Konzentration während der Lagerung.

In einer Vielzahl von Publikationen konnte ebenfalls sowohl ein Anstieg der Laktatkonzentration als auch ein Glukoseverbrauch während der Lagerung eines Thrombozytenpräparates nachgewiesen werden (Picker SM et al., 2006a; Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b; Dumont LJ et al., 2003; Böck M et al., 2002; Lin JS et al., 2001; Wagner SJ et al., 2008; Macher S et al., 2010; Slichter SJ et al., 2006). Unter Zellseparation mit der Trima Accel 5.1 konnten von Wagner et al. am Tag der Herstellung sowie an Tag 5 und Tag 7 der Lagerung annähernd gleiche Glukose- und Laktatkonzentrationen wie in unserer Studie gemessen werden (Wagner SJ et al., 2008). In mehreren Publikationen wurde ebenfalls von einem Anstieg der LDH-Konzentration während der Lagerung berichtet (Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b; Böck M et al., 2002; Macher S et al., 2010).

Die Ergebnisse unserer Studie spiegeln die metabolischen Vorgänge der Thrombozyten wieder. Der Vergleich mit anderen bereits publizierten Daten unterstützt die Ergebnisse unserer Studie.

5.2.4 Resterythrozyten, Restleukozyten und Sterilität

Mithilfe moderner Zellseparatoren lassen sich leukozytendepletierte TKs herstellen. Aus der Leukozytendepletion resultiert eine Reduktion von febrilen Transfusionsreaktionen und von Alloimmunisierungen. Außerdem führt eine Leukozytendepletion zu einem Rückgang von transfusionsassoziierten CMV-Infektionen und einer reduzierten CD62P-Expression auf Thrombozyten (Heddle NM et al., 2002; Vamvakas EC, 2005; Ahmed AS et al., 2010). Die nach den Richtlinien der BÄK maximal zulässige Restleukozytenzahl beträgt $< 1 \times 10^6$, die maximale Resterythrozytenzahl $< 3 \times 10^9$ pro Einheit (Richtlinien BÄK, 2010).

Die mögliche bakterielle Kontamination von Thrombozytenpräparaten ist noch immer ein relevantes Problem. Durch die Durchführung einer Risikoanamnese, einer gründlichen Hautdesinfektion und das Verwerfen der ersten 30 – 40 ml Blut vor jeder Apherese konnte eine Reduktion von bakteriell kontaminierten TKs erreicht werden. Mithilfe von Pathogeninaktivierungs- und Pathogenreduktionssystemen (Intersept™, Mirasol™) ist eine weitere Reduzie-

rung bakterieller Kontaminationen möglich (Schrezenmeier H et al., 2010; Seghatchian J et al., 2006; Goodrich RP et al., 2006; Robillard P et al., 2005). Der Nachweis von Bakterien gelingt in 0,02 – 1,2 % der untersuchten Präparate (Walther-Wenke G, 2008).

Die in unserer Studie untersuchten TKs erfüllten allesamt die Sterilitätskriterien. Keines der untersuchten Präparate überschritt die nach den Richtlinien der BÄK erforderliche Restleukozyten- und Resterythrozytenzahl pro Einheit. Die durchschnittliche Leukozytenzahl pro Einheit ergab $0,08 \pm 0,09 [\times 10^6]$.

In einer Vielzahl von Publikationen konnte unter Verwendung des Trima Accel-Sammelsystems eine erfolgreiche Leukozytendepletion nachgewiesen werden (Picker SM et al., 2006a; Picker SM et al., 2006b; Picker SM et al., 2009; Macher S et al., 2010; Fontana S et al., 2011). In der publizierten Arbeit von Moog wurde bei der Gewinnung von Dreifach-TKs mit der Trima Accel 5.0 eine etwas geringere Leukozytendepletion von $0,16 \pm 0,05 [\times 10^6]$ pro Einheit evaluiert. Die Resterythrozytenzahl von $0,01 \pm 0,01 [\times 10^9]$ stimmte hingegen mit der in unserer Studie überein (Moog R, 2009). In zahlreichen Arbeiten wurden mit der Trima Accel Resterythrozytenzahlen nachgewiesen, die bei $< 3 \times 10^9$ pro Einheit lagen (Picker SM et al., 2006a; Picker SM et al., 2006b; Picker SM et al., 2009; Macher S et al., 2010).

Durch die Herstellung von Dreifach-TKs mit der Trima Accel kann eine ausreichende Leukozytendepletion erreicht werden. Dies konnte sowohl durch unsere Studie wie auch durch zahlreiche weitere Publikationen gestützt werden. Weiterhin konnte eine geringe Resterythrozytenbelastung unter Verwendung des Trima Accel-Sammelsystems dargelegt werden.

5.2.5 Thrombozytenaktivierung mittels CD62P und Thrombozytenaggregation

Das CD62P-Antigen ist ein Aktivierungsmarker für Thrombozyten (Dekkers DW et al., 2007). Rinder et al. zeigten in ihrer Arbeit eine Korrelation zwischen der Lagerungszeit, der Menge an CD62P-positiven Plättchen in Thrombozytenpräparaten und einer erniedrigten „recovery“ nach einer Transfusion (Rinder HM et al., 1991). Ähnliche Ergebnisse konnten in weiteren Arbeitsgruppen gefunden werden (Triulzi DJ et al., 1992; Holme S et al., 1997; Stohlawetz P et al., 1999; Dumont LJ et al., 2007; Böck M et al., 2002).

Die Plättchenaggregation ist seit der Entdeckung durch G. V. R. Born im Jahre 1962 die Referenzmethode zum Nachweis qualitativer Plättchenstörungen. Zu beachten ist, dass die Empfindlichkeit der Messung wesentlich von der gewählten Konzentration des Agonisten abhängt.

Die in unserer Studie ermittelte durchschnittliche CD62P-Expression lag am Herstellungstag bei $21,2 \pm 5,8$ %, an Tag 5 der Lagerung bei $46,6 \pm 10,7$ % und an Tag 7 bei $61,6 \pm 7,3$ %. Die ADP- und Kollagen-induzierten Aggregationen nahmen während der Lagerung signifikant ab. Ein Vergleich der beiden Aggregationen untereinander zeigte eine signifikant größere Abnahme der ADP-induzierten Aggregation während der Lagerung. Diese Tatsache lässt sich durch die Verwendung einer relativ hohen Konzentration des weiteren Induktors Kollagen erklären.

In zahlreichen Publikationen konnte unter Verwendung verschiedener Zellseparatoren ein Anstieg der CD62P-Expression während der Lagerung von TKs registriert werden (Picker SM et al., 2006a; Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b; Albanyan AM et al., 2009; Skripchenko A et al., 2008; Picker SM et al., 2009; Dumont LJ et al., 2003; Böck M et al., 2002; Lin JS et al., 2001; Zimmermann R et al., 2001; Krailadsiri P et al., 2000; Wagner SJ et al., 2008; Macher S et al., 2010; Curvers J et al., 2004; Slichter SJ et al., 2006; Dumont LJ et al., 2002). In mehreren Arbeiten konnte mit der Trima Accel eine annähernd gleiche prozentuale CD62P-Expression wie in unserer Studie vom Herstellungstag bis zum Ende der Lagerung evaluiert werden (Picker SM et al., 2006a; Picker SM et al., 2009; Macher S et al., 2010). Der Anteil CD62P-positiver Blutplättchen lag in der Studie von Picker und Kollegen an Tag 1 bei $18,6 \pm 5,1$ % und an Tag 5 bei $42,6 \pm 4,0$ % (Picker SM et al., 2006a). In anderen Arbeiten zeigten sich in TKs, die mit dem Trima Accel-Sammelsystem hergestellt wurden, niedrigere CD62P-Expressionen als in unserer Studie (Tynngård N et al., 2008a; Tynngård N et al., 2008b; Albanyan AM et al., 2009; Skripchenko A et al., 2008; Wagner SJ et al., 2008). Wagner und Kollegen ermittelten eine durchschnittliche CD62P-Expression an Tag 1 von $13,3 \pm 7,4$ %, an Tag 5 von $33,8 \pm 12,1$ % und an Tag 7 von $40,6 \pm 15,3$ % (Wagner SJ et al., 2008). Die differierenden Ergebnisse könnten durch eine fehlende Standardisierung der Messmethode bedingt sein.

Die fehlende Standardisierung der Plättchenaggregation macht einen quantitativen Vergleich unserer Daten mit publizierten Daten unmöglich. In publizierten Arbeiten konnte unter Verwendung verschiedener Agonisten aber übereinstimmend ein Rückgang der Thrombozytenaggregation während der Lagerungsdauer beschrieben werden (Picker SM et al., 2006a; Picker SM et al., 2009; Böck M et al., 2002; Macher S et al., 2010).

Eine Aktivierung der Blutplättchen während der Lagerung, die sich in einem Anstieg der CD62P-Expression äußert, konnte durch unsere Studie sowie in Arbeiten anderer Autoren gezeigt werden. Die Abnahme der Thrombozytenaggregation während der Lagerung konnte durch die Ergebnisse unserer Arbeit und durch weitere Publikationen dargelegt werden.

5.3 Thrombozytentransfusion und korrigiertes Inkrement

Zur Beurteilung des Transfusionserfolges wird u.a. das korrigierte Inkrement herangezogen. Das CCI berücksichtigt dabei nicht nur den Thrombozytenanstieg im Empfängerblut, sondern auch das Blutvolumen des Empfängers und die Dosis transfundierter Blutplättchen. Höhere posttransfusionell gemessene korrigierte Inkremente gehen mit einem längeren Transfusionsintervall und dadurch mit einem reduzierten Bedarf an TKs einher (Heim D et al., 2008; Slichter SJ et al., 2005).

Eine Vielzahl von Faktoren sind in der Lage, den Transfusionserfolg eines TKs negativ zu beeinflussen. Einen negativen Einfluss auf den Transfusionserfolg, der mit einem niedrigeren korrigierten Inkrement einhergeht, hat die AB0-inkompatible TK-Transfusion (Pavenski K et al., 2010; Shehata N et al., 2009; Lee EJ et al., 1989; Heim D et al., 2008; Enein AA et al., 2007). Mit zunehmender Lagerungsdauer des Präparates bis zur Transfusion reduziert sich das CCI (Klüter H et al., 1996; Heim D et al., 2008; Enein AA et al., 2007). Das Vorliegen einer Splenomegalie, das Einnehmen bestimmter Medikamente (u.a. Amphotericin B, Vancomycin, Heparin), das Vorhandensein von HLA- und HPA-Antikörpern, Infektionen, Fieber, aktiven Blutungen und einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) sowie bestimmte Patientencharakteristika und eine hohe Transfusionsfrequenz wirken sich nachteilig auf den Transfusionserfolg aus (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008; Stroncek DF et al., 2007; Slichter SJ, 2007; AuBuchon JP et al., 2004; McVey M et al., 2010; Enein AA et al., 2007; Slichter SJ et al., 2005; Bishop JF et al., 1991). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Gammabestrahlung eines TKs einen negativen Einfluss auf den Transfusionserfolg hat (Julmy F et al., 2008; Slichter SJ et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Arbeiten kein negativer Effekt der Gammabestrahlung auf die posttransfusionell ermittelte Plättchenkonzentration nachgewiesen (Read EJ et al., 1988; Sweeney JD et al., 1994). Die Refraktärität wird bei Patienten mit Tumoren oder hämatologischen Erkrankungen in 72 – 88 % durch nicht-immunologische Faktoren hervorgerufen, in 25 – 39 % der Fälle spielen HLA-Antikörper eine Rolle (Novotny VM et al., 1995; Doughty HA et al., 1994; Legler TJ et al., 1997).

In unserer Studie wurden 43 Thrombozytentransfusionen durchgeführt. Es wurde bei einem 1h-CCI $< 7,5$ und bei einem 24h-CCI $< 4,5$ von einer Refraktärität ausgegangen (Querschnitts-Leitlinien BÄK, 2008). Das 1h-CCI konnte im Mittel mit $12,4 \pm 6,0$ und das 24h-CCI mit $4,9 \pm 7,5$ erhoben werden. Nach 1 h lag bei 25,6 % der Patienten eine Refraktärität vor, nach 18 – 24 h betrug der Anteil an Patienten mit einem Refraktärzustand 53,5 %.

Fontana et al. verabreichten 43 TKs, die unter Verwendung der Trima Accel 5.0 hergestellt wurden, an 20 überwiegend hämato-onkologische Patienten. Die transfundierten TKs enthielten im Durchschnitt $2,4 [\times 10^{11}]$ Plättchen pro Einheit bei einer durchschnittlichen Lagerungszeit von 3,9 Tagen. Der Großteil der TKs (55,8 %) wurde AB0-identisch transfundiert. Lediglich 18,6 % der transfundierten TKs wurden majorkompatibel, die restlichen 25,6 % minor-kompatibel verabreicht. In 69,8 % aller Transfusionen konnte ein 1h-CCI $> 7,5$ offenbart werden. Das korrigierte Inkrement nach 18 – 24 h zeigte in 37,2 % aller Transfusionen einen Wert $> 5,0$. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede bezüglich des 1h-CCIs in Abhängigkeit von dem gespendeten Plättchenertrag ($< 4 [\times 10^{11}]$ vs. $> 4 [\times 10^{11}]$ und $< 6 [\times 10^{11}]$ vs. $> 6 [\times 10^{11}]$) dargelegt werden (Fontana S et al., 2006). In unserer Studie konnten, bei einer identischen Anzahl an durchgeführten Transfusionen, niedrigere Raten an Refraktärzuständen erhoben werden. Insgesamt wiesen in der hiesigen Studie 74,4 % der Patienten ein 1h-CCI $> 7,5$ auf. Nach 18 – 24 h zeigten 41,9 % dieser Patienten ein CCI $> 5,0$.

Julmy et al. transfundierten 293 TKs, die mit dem Zellseparator Trima Accel 5.0 hergestellt wurden, an Kindern, die aufgrund einer Chemotherapie an einer Thrombozytopenie oder an einer aplastischen Anämie litten. Die im Präparat enthaltene Menge an Blutplättchen betrug im Durchschnitt $2,4 [\times 10^{11}]$. Bei der statistischen Auswertung zeigten sich geringere korrigierte Inkremente nach 1h mit steigendem Plättchenertrag. Das 1h-CCI bei einem erzielten Plättchenertrag von $< 6 [\times 10^{11}]$ betrug 18,4. Bei Thrombozytapheresen mit einem erzielten Plättchenertrag $\geq 10 [\times 10^{11}]$ konnte ein 1h-CCI von lediglich 11,5 evaluiert werden. Im Vergleich zu unserer Studie konnten Julmy und Kollegen bei einem gespendeten Plättchenertrag, der zwischen $\geq 6 [\times 10^{11}]$ und $< 10 [\times 10^{11}]$ lag, ein im Durchschnitt etwas größeres 1h-CCI von 15,0 – 17,0 nachweisen (Julmy F et al., 2008). Die aufgezeigte Differenz zur hiesigen Studie könnte u.a. durch die unterschiedlichen Patientenkollektive bedingt sein.

Das von Heim et al. ermittelte durchschnittliche 1h-CCI von 14,1 lag annähernd auf gleichem Niveau wie in unserer Studie. Die transfundierten TKs wurden allesamt mithilfe des Zellseparators Amicus hergestellt. Der Großteil des Patientenkollektivs litt ebenfalls unter hämato-onkologischen Erkrankungen (Heim D et al., 2008). Einen im Vergleich zu unserer Studie nahezu identischen prozentualen Anteil an Refraktärzuständen konnte durch Akkök und Kollegen erhoben werden. Die TKs wurden mit dem Zellseparator Amicus produziert und an Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen transfundiert (Akkök CA et al., 2007).

Zusammenfassend konnte in unserer Studie mithilfe des Parameters CCI ein zufrieden stellender und mit der Literatur vergleichbarer Plättchenanstieg mit TKs aus der Tripel-Apherese aufgezeigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed AS, Leheta O, Younes S. In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. *Blood Transfus*, 2010; 8:28-35.
2. Akkøk CA, Brinch L, Lauritzsen GF, Solheim BG, Kjeldsen-Kragh J. Clinical effect of buffy-coat vs. apheresis platelet concentrates in patients with severe thrombocytopenia after intensive chemotherapy. *Vox Sang*, 2007; 93:42-48.
3. Albanyan AM, Harrison P, Murphy MF. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion*, 2009; 49:108-117.
4. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol*, 2004; 126:298-306.
5. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Murphy S. Preliminary validation of a new standard of efficacy for stored platelets. *Transfusion*, 2004; 44:36-41.
6. Barker LM, Nanassy OZ, Reed MW, Geelhood SJ, Pfalzgraf RD, Cangelosi GA, de Korte D. Multiple pH measurement during storage may detect bacterially contaminated platelet concentrates. *Transfusion*, 2010; 50:2731-2737.
7. Baskett TF. James Blundell: the first transfusion of human blood. *Resuscitation*, 2002; 52:229-233.
8. Bedienungsanleitung Trima Accel® automatisches Blutkomponenten-Sammelsystem für die Versionen 5.0 – 5.1. CaridianBCT, 2008.
9. Benedum J. History of the Development of Blood Transfusion. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2001; 36:83-86.
10. Bertolini F, Murphy S. A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 1996; 36:128-132.
11. Bishop JF, Matthews JP, McGrath K, Yuen K, Wolf MM, Szer J. Factors influencing 20-hour increments after platelet transfusion. *Transfusion*, 1991; 31:392-396.
12. Blumberg N, Heal JM, Phillips GL. Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks. *F1000 Med Rep*, 2010; 2:5.
13. Blundell J. Experiments on the transfusion of blood by the syringe. *Med Chir Trans*, 1818; 9:56-92.
14. Blundell J. Observations on transfusion of blood. *Lancet*, 1828; 2:321-324.

15. Böck M, Rahrig S, Kunz D, Lutze G, Heim MU. Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis: biochemical and functional differences. *Transfus Med*, 2002; 12:317-324.
16. Bolan CD, Greer SE, Cecco SA, Oblitas JM, Rehak NN, Leitman SF. Comprehensive analysis of citrate effects during plateletpheresis in normal donors. *Transfusion*, 2001; 41:1165-1171.
17. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962; 194:927-929.
18. Brecher ME, Hay SN. Transfusion medicine illustrated. Platelet swirling. *Transfusion*, 2004; 44:627.
19. Bueno JL. Do we really know the real risks of apheresis donation? *ISBT Sci Ser*, 2007; 2:68-74.
20. Bueno JL, García F, Castro E, Barea L, González R. A randomized crossover trial comparing three plateletpheresis machines. *Transfusion*, 2005; 45:1373-1381.
21. Burgstaler EA, Winters JL, Pineda AA. Paired comparison of Gambro Trima Accel versus Baxter Amicus single-needle plateletpheresis. *Transfusion*, 2004; 44:1612-1620.
22. Burstain JM, Brecher ME, Workman K, Foster M, Faber GH, Mair D. Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips: glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion*, 1997; 37:255-258.
23. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang*, 2005; 88:153-163.
24. Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 6th edition, 2000.
25. Curvers J, van Pampus EC, Feijge MA, Rombout-Sestrienkova E, Giesen PL, Heemskerk JW. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion*, 2004; 44:49-58.
26. Davis KB, Slichter SJ, Corash L. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution. *Transfusion*, 1999; 39:586-592.
27. Dekkers DW, De Cuyper IM, van der Meer PF, Verhoeven AJ, de Korte D. Influence of pH on stored human platelets. *Transfusion*, 2007; 47:1889-1895.
28. Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev*, 2000; 14:180-196.
29. Despotis GJ, Goodnough LT, Dynis M, Baorto D, Spitznagel E. Adverse events in platelet apheresis donors: A multivariate analysis in a hospital-based program. *Vox Sang*, 1999; 77:24-32.

30. Dettke M, Hlousek M, Kurz M, Leitner G, Roskopf K, Stiegler G, Stohlawetz P, Worel N, Höcker P, Panzer S. Increase in endogenous thrombopoietin in healthy donors after automated plateletpheresis. *Transfusion*, 1998; 38:449-453.
31. Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RN, Huijgens PC. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. *Vox Sang*, 2004; 87:257-263.
32. Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, Rohatiner AZ, Lister TA, Waters AH. Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. *Vox Sang*, 1994; 66:200-205.
33. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic diseases relieved by transfusion. *JAMA*, 1910; 55:1185-1192.
34. Dumont LJ, AuBuchon JP, Whitley P, Herschel LH, Johnson A, McNeil D, Sawyer S, Roger JC. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion*, 2002; 42:847-854.
35. Dumont LJ, Gulliksson H, van der Meer PF, Murphy S, Nixon JG, de Wildt-Eggen J, Vandenbroeke T, Aubuchon JP. Interruption of agitation of platelet concentrates: a multicenter in vitro study by the BEST Collaborative on the effects of shipping platelets. *Transfusion*, 2007; 47:1666-1673.
36. Dumont LJ, VandenBroeke T. Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. *Transfusion*, 2003; 43:143-150.
37. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favaloro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, Gamble JR, Vadas MA, Berndt MC. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med*, 1992; 175:1147-1150.
38. Eichler H, Klüter H. Therapy with cellular blood components. *Internist*, 2001; 42:760-768.
39. Enein AA, Hussein EA, El Shafie S, Hallouda M. Factors affecting platelet yield and their impact on the platelet increment of patients receiving single donor PLT transfusion. *J Clin Apher*, 2007; 22:5-9.
40. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, de Sauvage FJ. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood*, 1996; 87:2154-2161.
41. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol*, 2006; 4:445-457.
42. Flesch BK, Adamzik I, Steppat D, Miller J, Carstensen L, Schapke M, Davey J. Paired crossover study of two plateletpheresis systems concerning platelet product quality and donor comfort. *Transfusion*, 2010; 50:894-901.

43. Fontana S, Mordasini L, Keller P, Taleghani BM. Prospective, paired crossover comparison of multiple, single-needle plateletpheresis procedures with the Amicus and Trima Accel cell separators. *Transfusion*, 2006; 46:2004-2010.
44. Fontana S, Rados L, Schmid P, Leibundgut EO, Taleghani BM. Recruitment of platelets, white blood cells, and hematopoietic progenitor cells during high-yield plateletpheresis. *Transfusion*, 2011; Epub ahead of print.
45. Geserick G, Wirth I, Strauch H. 100 Jahre Forensische Serologie. *Rechtsmedizin*, 2001; 11:198-204.
46. Giangrande PLF. The history of blood transfusion. *British Journal of Haematology*, 2000; 110:758-767.
47. Gilstad CW. Anaphylactic transfusion reactions. *Curr Opin Hematol*, 2003; 10:419-423.
48. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci*, 2006; 35:5-17.
49. Greenwalt TJ. A short history of transfusion medicine. *Transfusion*, 1997; 37:550-563.
50. Greinacher A, Fendrich K, Alpen U, Hoffmann W. Impact of demographic changes on the blood supply: Mecklenburg-West Pomerania as a model region for Europe. *Transfusion*, 2007; 47:395-401.
51. Gross H. Transfusionsmedizin: Immer weniger Blutspender in Deutschland. *Dtsch med Wochenschr*, 2007; 132:24.
52. Gulliksson H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev*, 2003; 17:209-215.
53. Hagberg IA, Akkok CA, Lyberg T, Kjeldsen-Kragh J. Apheresis-induced platelet activation: comparison of three types of cell separators. *Transfusion*, 2000; 40:182-192.
54. Heckman KD, Weiner GJ, Davis CS, Strauss RG, Jones MP, Burns CP. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukemia: 10,000/microL versus 20,000/microL. *J Clin Oncol*, 1997; 15:1143-1149.
55. Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, Lipton JH, Walker IR, Sher GD, Constantini LA, Patterson B, Roberts RS, Thorpe KE, Levine MN. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. *Transfusion*, 2002; 42:556-566.
56. Heim D, Passweg J, Gregor M, Buser A, Theodorides A, Arber C, Meyer-Monard S, Halter J, Tichelli A, Gratwohl A. Patient and product factors affecting platelet transfusion results. *Transfusion*, 2008; 48:681-687.
57. Hellstern P, Hitzler W. Thrombozytenkonzentrate aus Vollblutspenden – time to say goodbye. *Transfus Med Hemother*, 2007; 34:208-210.

58. Henseler O, Heiden M, Haschberger B, Hesse J, Seitz R. Report on notifications pursuant to Section 21 of the German Transfusion Act for the years 2008 and 2009. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2010; 53:1089-1103.
59. Hervig T, Bakken AM, Farstad M. The swirling phenomenon in stored platelets is influenced by their endogenous serotonin. *Transfus Med*, 1999; 9:139-145.
60. Holme S. Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sang*, 1998; 74:207-216.
61. Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion*, 1997; 37:12-17.
62. Hundelshausen P von, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2007; 100:27-40.
63. Jelkmann W. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001; 13:791-801.
64. Jilma-Stohlawetz P, Eichelberger B, Horvath M, Jilma B, Panzer S. In vitro platelet function of platelet concentrates prepared using three different apheresis devices determined by impedance and optical aggregometry. *Transfusion*, 2009; 49:1564-1568.
65. Jin F, Krzyzanski W. Pharmacokinetic model of target-mediated disposition of thrombopoietin. *AAPS PharmSci*, 2004; 6:E9.
66. Julmy F, Ammann RA, Mansouri Taleghani B, Fontana S, Hirt A, Leibundgut K. Effects of high-yield thrombocytapheresis on the quality of platelet products. *Transfusion*, 2008; 48:442-450.
67. Jurk K, Kehrel BE. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Dtsch med Wochenschr*, 2008; 133:1130-1135.
68. Kaiser F, Weisbach V, Goudeva L, Moog R, Zingsem J, Eckstein R, Heuft HG. The Influence of Intensified Triple Platelet Apheresis on Systemic Levels of Hematopoietic Growth Factors. *Transfus Med Hemother*, 2008; 35:12.
69. Kato T, Matsumoto A, Ogami K, Tahara T, Morita H, Miyazaki H. Native thrombopoietin: structure and function. *Stem Cells*, 1998; 16:11-19.
70. Katz L, Palmer K, McDonnell E, Kabat A. Frequent plateletpheresis does not clinically significantly decrease platelet counts in donors. *Transfusion* 2007; 47:1601-1606.
71. Kaufman RM. Platelets: testing, dosing and the storage lesion--recent advances. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006; 492-496.
72. Kaushansky K. Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *J Thromb Haemost*, 2003; 1:1587-1592.

73. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*, 2005; 115:3339-3347.
74. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009; 147-152.
75. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*, 1994; 369:568-571.
76. King KE, Shirey RS, Thoman SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RBCs. *Transfusion*, 2004; 44:25-29.
77. Klüter H, Dörge L, Maass E, Wagner T, Bartels H, Kirchner H. In-vivo evaluation of random donor platelet concentrates from pooled buffy coats. *Ann Hematol*, 1996; 73:85-89.
78. Kopko PM, Holland PV. Transfusion-related acute lung injury. *Br J Haematol*, 1999; 105:322-329.
79. Koruk M, Onuk MD, Akçay F, Savas MC. Serum thrombopoietin levels in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, and its relationship with circulating thrombocyte counts. *Hepatology*, 2002; 49:1645-1648.
80. Krailadsiri P, Seghatchian J. Are all leucodepleted platelet concentrates equivalent? Comparison of Cobe LRS Turbo, Haemonetics MCS+ LD, and filtered pooled buffy-coat-derived platelets. *Vox Sang*, 2000; 78:171-175.
81. Kuter DJ. Thrombopoietin and thrombopoietin mimetics in the treatment of thrombocytopenia. *Annu Rev Med*, 2009; 60:193-206.
82. Landsteiner K. Individual Differences in Human Blood. *Science*, 1931; 73:403-409.
83. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1940; 43: 223–224.
84. Laspina SJ, Browne MA, McSweeney EN, Lawlor J, Whelan DM, Kinsella AL, Murphy WG. QTc prolongation in apheresis platelet donors. *Transfusion*, 2002; 42:899-903.
85. Lee EJ, Schiffer CA. ABO compatibility can influence the results of platelet transfusion. Results of a randomized trial. *Transfusion*, 1989; 29:384-389.
86. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A, Riggert J, Schleyer E, Kern W, Hiddemann W, Köhler M. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. *Ann Hematol*, 1997; 74:185-189.
87. Li J, Xia Y, Kuter DJ. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. *Br J Haematol*, 1999; 106:345-356.

88. Lin JS, Tzeng CH, Hao TC, Hu HY, Tsai YC, Lin CP, Yung CH. Influence of gamma irradiation and storage on apheresis platelets. *J Formos Med Assoc*, 2001; 100:101-105.
89. Loutit JF, Mollison PL, Young IM. Citric acid-sodium citrate-glucose mixtures for blood storage. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 1943; 32:183-202.
90. Lower R. The Method observed in Transfusing the Blood out of one Animal into another. *Philos Trans* 1, 1666; 20:353-358.
91. Macher S, Sipurzynski-Budraß S, Roskopf K, Rohde E, Griesbacher A, Groselj-Strele A, Lanzer G, Schallmoser K. Function and activation state of platelets in vitro depend on apheresis modality. *Vox Sang*, 2010; 99:332-340.
92. Makar YF, Butler MO, Cockersole GM, Gabra G, Serevitch JM. National audit of citrate toxicity in plateletpheresis donors. *Transfus Med*, 2002; 12:187-191.
93. McGlasson DL, Fritsma GA. Whole blood platelet aggregometry and platelet function testing. *Semin Thromb Hemost*, 2009; 35:168-180.
94. McIntosh B, Kaushansky K. Transcriptional regulation of bone marrow thrombopoietin by platelet proteins. *Exp Hematol*, 2008; 36:799-806.
95. McLeod BC, Price TH, Owen H, Ciavarella D, Sniecinski I, Randels MJ, Smith JW. Frequency of immediate adverse effects associated with apheresis donation. *Transfusion*, 1998; 38:938-943.
96. McVey M, Cserti-Gazdewich CM. Platelet transfusion refractoriness responding preferentially to single donor aphaeresis platelets compatible for both ABO and HLA. *Transfus Med*, 2010; 20:346-353.
97. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:11877-11882.
98. Moog R. Feasibility and safety of triple dose platelet collection by apheresis. *J Clin Apher*, 2009; 24:238-240.
99. Moog R, Heuft HG, Zingsem J. Donor safety and tolerance in triple platelet dose collections: results from 2169 aphereses of a hemapheresis multicenter trial. *J Clin Apheresis*, 2008; 23:11-12.
100. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*, 1987; 317:1098.
101. Müller-Eckhardt C, Kiefel V. *Transfusionsmedizin*, 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004.
102. Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 1975; 46:209-218.

103. Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery*, 1962; 51:224-232.
104. Novotny VM, van Doorn R, Witvliet MD, Claas FH, Brand A. Occurrence of allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study. *Blood*, 1995; 85:1736-1741.
105. Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion*, 2004; 44:16-24.
106. Pavenski K, Warkentin TE, Shen H, Liu Y, Heddle NM. Posttransfusion platelet count increments after ABO-compatible versus ABO-incompatible platelet transfusions in noncancer patients: an observational study. *Transfusion*, 2010; 50:1552-1560.
107. Picker SM, Radojska SM, Gathof BS. A prospective Crossover Trial Comparing Performance and in vitro Platelet Quality of Three New Apheresis Devices with Current Equipment. *Transfus Med Hemother*, 2006a; 33:520-527.
108. Picker SM, Radojska SM, Gathof BS. Prospective comparison of high-dose plateletpheresis with the latest apheresis systems on the same donors. *Transfusion*, 2006b; 46:1601-1608.
109. Picker SM, Schneider V, Gathof BS. Platelet function assessed by shear-induced deposition of split triple-dose apheresis concentrates treated with pathogen reduction technologies. *Transfusion*, 2009; 49:1224-1232.
110. Pötzsch B, Madlener K. Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie, 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
111. Produktinformation Quantikine® Human TPO Immunoassay for the quantitative determination of human Thrombopoietin (Tpo) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma. R&D Systems, 2009.
112. Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Herausgegeben vom Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung ihres Wissenschaftlichen Beirats. Deutscher Ärzte-Verlag, 2008.
113. Quraishi N, Notari EP, Burch JW, Eder AF, Heal J, Janas J, Miller Y, Moroff G, Siegfried B, Strupp AM, Vassallo RR, Wise E, Benjamin RJ. Impact of frequent plateletpheresis on donor platelet counts. *Transfusion*, 2006; 46S:5A.
114. Read EJ, Kodis C, Carter CS, Leitman SF. Viability of platelets following storage in the irradiated state. A pair-controlled study. *Transfusion*, 1988; 28:446-450.
115. Richa E, Krueger P, Burgstaler EA, Bryant SC, Winters JL. The effect of double- and triple-apheresis platelet product donation on apheresis donor platelet and white blood cell counts. *Transfusion*, 2008; 48:1325-1332.

116. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Aufgestellt gemäß §§ 12 a und 18 Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich Institut Gesamtnovelle 2005, mit Richtlinienanpassung 2010. Deutscher Ärzte-Verlag, 2010.
117. Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hillman RS. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion*, 1991; 31:409-414.
118. Ringwald J, Duerler T, Frankow O, Zimmermann R, Zingsem J, Strasser E, Antoon M, Eckstein R. Collection of hyperconcentrated platelets with Trima Accel. *Vox Sang*, 2006; 90:92-96.
119. Ringwald J, Zingsem J, Zimmermann R, Strasser E, Antoon M, Eckstein R. First comparison of productivity and citrate donor load between the Trima version 4 (dual-stage filler) and the Trima Accel (single-stage filler) in the same donors. *Vox Sang*, 2003; 85:267-275.
120. Robillard P, Nawej K, Delage G. Platelet bacterial contamination and effectiveness of diverting the first 40 mls at whole blood donation. *Transfusion*, 2005; 45:25a.
121. Salama A, Huhn D. Thrombozytentransfusion – Indikationsstellung, Präparate und Begleituntersuchungen. *Der Onkologe*, Springer Verlag, 1998; 4:185-190.
122. Sanchez R, Malone M, Schuh J, Hirschler N, Nguyen KT. Does frequent plateletpheresis donation deplete donor platelets? A longitudinal evaluation. *Transfusion*, 2006; 46S:5-6A.
123. Schöffski P, Tacke F, Ganser A, Trautwein C, Martin MU, Petersen D. Plateletpheresis does not lead to a lasting increase in serum thrombopoiesis growth factor levels. *Transfusion*, 1999; 39:429-431.
124. Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang*, 2010; 99:1-15.
125. Seghatchian J, de Sousa G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci*, 2006; 35:189-196.
126. Shehata N, Tinmouth A, Naglie G, Freedman J, Wilson K. ABO-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review. *Transfusion*, 2009; 49:2442-2453.
127. Singh H, Chaudhary R, Ray V. Evaluation of platelet storage lesions in platelet concentrates stored for seven days. *Indian J Med Res*, 2003; 118:243-246.
128. Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion*, 2008; 48:1469-1477.
129. Slichter SJ. Platelet transfusion therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007; 21:697-729.

130. Slichter SJ, Bolgiano D, Jones MK, Christoffel T, Corson J, Rose L, Foley J, Popovsky M, Baril LL, Corda T, Dincecco DM, Snyder EL. Viability and function of 8-day-stored apheresis platelets. *Transfusion*, 2006; 46:1763-1769.
131. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, Kickler T, Lee E, McFarland J, McCullough J, Rodey G, Schiffer CA, Woodson R. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*, 2005; 105:4106-4114.
132. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, 1985; 101:880-886.
133. Stohlawetz P, Horvath M, Pernerstorfer T, Nguyen H, Vondrovec B, Robisch A, Eichler HG, Spitzauer S, Jilma B. Effects of nitric oxide on platelet activation during plateletpheresis and in vivo tracking of biotinylated platelets in humans. *Transfusion*, 1999; 39:506-514.
134. Strasser EF, Schuster M, Egler K, Bauer J, Weisbach V, Ringwald J, Zimmermann R, Zingsem J, Eckstein R. Frequently used plateletpheresis techniques result in variable target yields and platelet recruitment of donors. *Transfusion*, 2005; 45:788-797.
135. Strauss RG. Mechanism of adverse effects during hemapheresis. *J Clin Apheresis*, 1996; 11:160-164.
136. Strauss RG. Safety of donating multiple products in a single apheresis collection: are we expecting too much? *J Clin Apher*, 2003; 18:135-140.
137. Stroncek DF, Rebutta P. Platelet transfusions. *Lancet*, 2007; 370:427-438.
138. Stuart MJ, Murphy S, Oski FA, Evans AE, Donaldson MH, Gardner FH. Platelet function in recipients of platelets from donors ingesting aspirin. *N Engl J Med*, 1972; 287:1105-1109.
139. Sweeney JD, Holme S, Moroff G. Storage of apheresis platelets after gamma radiation. *Transfusion*, 1994; 34:779-783.
140. Tacke F, Schöffski P, Trautwein C, Martin MU, Stangel W, Seifried E, Manns MP, Ganser A, Petersen D. Endogenous serum levels of thrombopoietic cytokines in healthy whole-blood and platelet donors: implications for plateletpheresis. *Br J Haematol*, 1999; 105:511-513.
141. Triulzi DJ, Kickler TS, Braine HG. Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis. *Transfusion*, 1992; 32:529-533.
142. Tynngård N, Lindahl TL, Trinks M, Studer M, Berlin G. The quality of platelet concentrates produced by COBE Spectra and Trima Accel cell separators during storage for 7 days as assessed by in vitro methods. *Transfusion*, 2008a; 48:715-722.

143. Tynngård N, Studer M, Lindahl TL, Trinks M, Berlin G. The effect of gamma irradiation on the quality of apheresis platelets during storage for 7 days. *Transfusion*, 2008b; 48:1669-1675.
144. Vamvakas EC. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev*, 2005; 19:181-199.
145. Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost*, 2004; 92:459-466.
146. Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol*, 2006a; 13:323-330.
147. Vassallo RR, Murphy S, Notari EP. Changes in donor platelet counts with repeated plateletpheresis procedures. *Transfusion* 2006b; 46S:5A.
148. Vassallo RR Jr, Wahab F, Giordano K, Murphy S. Improving technology for collecting platelets by apheresis: five-year experience in one blood center. *Transfus Med*, 2004; 18:257-266.
149. Wagner SJ, Robinette D. Evaluation of swirling, pH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfusion*, 1996; 36:989-993.
150. Wagner SJ, Vassallo R, Skripchenko A, Einarson M, Seetharaman S, Moroff G. The influence of simulated shipping conditions (24- or 30-hr interruption of agitation) on the in vitro properties of apheresis platelets during 7-day storage. *Transfusion*, 2008; 48:1072-1080.
151. Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components. *Clin Chem Lab Med*, 2008; 46:919-925.
152. Walton MT. The first blood transfusion: French or English? *Med Hist*, 1974; 18:360-364.
153. Webster C. The origins of blood transfusion: a reassessment. *Med Hist*, 1971; 15:387-392.
154. Weisbach V, Friedlein H, Glaser A, Zingsem J, Zimmermann R, Eckstein R. The influence of automated plateletpheresis on systemic levels of hematopoietic growth factors. *Transfusion*, 1999; 39:889-894.
155. Wiebecke D, Fischer K, Keil G, Leibling R, Reissigl H, Stangel W. Zur Geschichte der Transfusionsmedizin in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts (unter besonderer Berücksichtigung ihrer Entwicklung in Deutschland). *Transfus Med Hemother*, 2004; 31:12-31.
156. Wiltbank TB, Giordano GF. The safety profile of automated collections: an analysis of more than 1 million collections. *Transfusion*, 2007; 47:1002-1005.
157. Winters JL. Complications of donor apheresis. *J Clin Apher*, 2006; 21:132-141.

158. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion*, 2004; 44:10-15.
159. Young JH. James Blundell (1790-1877) physiologist and obstetrician. *Med Hist*, 1964; 8:159-169.
160. Yuan S, Ziman A, Smeltzer B, Lu Q, Goldfinger D. Moderate and severe adverse events associated with apheresis donations: incidences and risk factors. *Transfusion*, 2010; 50:478-486.
161. Zantek ND, Pederson B, Perry E, Gorlin JB. Platelet count and donation rates of frequent plateletpheresis donors. *Transfusion*, 2006; 46S:40A.
162. Zimmermann R, Schmidt S, Zingsem J, Glaser A, Weisbach V, Ruf A, Eckstein R. Effect of gamma radiation on the in vitro aggregability of WBC-reduced apheresis platelets. *Transfusion*, 2001; 41:236-242.
163. Zingsem J, Moog R. Preparative Haemapheresis and Donor Safety. *Transfus Med Hemother*, 2004; 31:5-6.

7. Publikationen

Gross J, Stetzenbach M, Kekukh E, Eichler H. Consecutive triple platelet apheresis donations have no impact on serum Thrombopoietin (TPO) levels in donors. Eingereicht als Postervortrag für den 44. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI).

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler, Direktor des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der materiellen Voraussetzungen sowie für die hervorragende Beratung und Unterstützung im Ablauf der Arbeit.

Herrn Dr. med. Jürgen Groß danke ich für die hilfreiche Unterstützung, die freundliche Beratung und die konstruktive Kritik bei der Planung und Durchführung der Promotionsarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei dem ganzen Blutspendeteam für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Susanne Rohr, die mich während der Arbeit im Labor beispielhaft unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt den Spendern des Blutspendedienstes und den Patienten für die Teilnahme an der Studie.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Geisel, Leiter des Zentrallabors, und Herrn Dr. med. Ulrich Hübner für die Unterstützung und die Einarbeitung.

Bei meiner Mutter möchte ich mich ganz herzlich für die liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und der Promotion bedanken.

9. Lebenslauf

Name Michael Stetzenbach

Geburtsdatum 05.02.1986

Geburtsort Kaiserslautern

Familienstand ledig

Schulbildung:

1992 – 1996: Grundschule Mackenbach

1996 – 2005: Burggymnasium Kaiserslautern, Allgemeine Hochschulreife

Studium:

WS 2005/ 2006: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

2007: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2010 – 2011: Praktisches Jahr: Knappschafts Krankenhaus Sulzbach,
Wahlfach: Anästhesie